



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA DIROFILARIOSE  
CARDIOPULMONAR CANINA NO CONCELHO DE BENAVENTE, PORTUGAL

JULIANA DE SOUSA MOREIRA DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

ORIENTADOR

Dr. Frederico Miguel Alves Inácio

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2018  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA DIROFILARIOSE  
CARDIOPULMONAR CANINA NO CONCELHO DE BENAVENTE, PORTUGAL

JULIANA DE SOUSA MOREIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

ORIENTADOR

Dr. Frederico Miguel Alves Inácio

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2018  
LISBOA

---

### **Declaração relativa à ortografia empregue**

Por escolha expressa da autora não é utilizado o Acordo Ortográfico 1990, ao abrigo dos Direitos de Autor, Decreto-Lei nº 32/73, de 6 de Fevereiro e nº 63/85 de 16 de Março.

## **Agradecimentos**

À fantástica equipa da VetSam, por serem um exemplo de excelente profissionalismo, pela vontade de fazer sempre mais e melhor, pela constante evolução e por nunca desistirem da luta pelos vossos ideais. Ao meu orientador, Dr. Frederico Alves Inácio, nunca poderei agradecer o suficiente pela forma como me recebeu, por todo o conhecimento que me transmite, confiança depositada em mim e pela paciência! À Dra. Rita, por me assegurar que ser médica veterinária não é assim tão impossível, por todos os ensinamentos, palavras amigas e disponibilidade. Por serem verdadeiros super-heróis. Ao Dr. Gonçalo pelo interesse em ensinar e querer saber sempre mais. À Ana, por me ter recebido tão bem, por todas as conversas, apoio e palavras amigas, por zelar pelos meus interesses como pelos de toda a equipa, por ser um exemplo de trabalho, gestão, sensatez e por manter o grupo unido. À enfermeira Fátima, a primeira pessoa com quem iniciei o meu primeiro dia de estágio e com quem viria a aprender muito, muito obrigada pela paciência, pela partilha de conhecimentos e por todas as conversas. À Mara, sem a qual a VetSam nunca seria a mesma, por ser a melhor combinação entre disciplina de trabalho e brincadeira, por colocar um sorriso na cara de toda a gente todos os dias, pela injeção diária de boa energia. Por todo o apoio e ajuda que me deu ao longo do estágio. Sem si, os dias não teriam metade da graça! Mais do que colegas, vejo-os a todos como amigos.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, que é para mim uma referência enquanto docente e investigador, pelo seu gosto genuíno na partilha de conhecimentos com os alunos, pela sempre pronta ajuda, disponibilidade e compreensão que se estendeu até à realização desta dissertação.

Ao Professor Telmo Nunes, que com grande generosidade e simpatia recebe todos os alunos numa altura de grandes dúvidas e incertezas. Pelo seu interesse e conselhos preciosos, muito obrigada.

Ao Professor Doutor João Barcelos, a alma do curso de Medicina Veterinária na Universidade dos Açores, por ser uma verdadeira inspiração e uma referência que levarei comigo para sempre. À Professora Isilda Flor pela sua dedicação e paixão à profissão. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, por apoiarem esta jornada sem pedir muito em troca, pelo espírito de sacrifício, por respeitarem as minhas opções e ajustarem a sua realidade à minha. Sem vocês seria impossível.

Aos meus avós, por terem desejado sempre o melhor do mundo para mim. À minha família, por serem assim.

Ao Rúben, por me ter aturado claro. Pela extrema paciência nas mil vezes que eu dizia que afinal era demasiado difícil ser médica veterinária. Por me incentivares a ser a melhor versão de mim mesma e mostrares-te sempre disponível para ver mais uma fotografia de patologias às vezes não muito bonitas.

À São e ao Carlos, por todo o apoio, entusiasmo e conversas ao longo destes anos.

À Fabiana, com quem posso passar o dia a falar sobre os nossos animais sem nos cansarmos. Pela amizade e companhia tão boas, pelas séries e filmes partilhados, lanches elaborados e saídas à noite que ficavam só por casa porque a nossa música é melhor! Pela partilha das melhores e piores emoções. Por tudo.

À Francisca, por ser a minha irmã de outra mãe, pela amizade e afinidade sentidas desde o início, por me acolher num local que não conhecia e fazer-me sentir em casa. Por todos os momentos partilhados, por teres sempre uma palavra amiga e por seres a melhor cabeleireira de sempre! Que continuemos assim para sempre.

A todos os meus animais, Mishka, Ninja, Florinda e Flopy, que participaram neste estudo. Ao Lupi, que nunca esquecerei. À Zoe, a cadela que mudou a minha vida ao me facilitar a descoberta do mundo do treino canino. Ao Aragorn, por me acompanhar há 13 anos e ainda não nos ter deixado e ao Brownie, por saber andar à trela sem que ninguém o tenha ensinado. Ao Simba, o gato mais perfeito de sempre, ao Freddie o mais meigo e ansioso de sempre, à Blue, a mais doida e alegre, à Roberta e à Taily, as mais queridas.

## Resumo

### **Caracterização clínica e epidemiológica da dirofilariose cardiopulmonar canina no concelho de Benavente, Portugal**

O concelho de Benavente localiza-se numa zona hiperendémica de dirofilariose cardiopulmonar canina. O presente estudo teve como principal objectivo a identificação das alterações clínicas mais significativas nos cães infectados e verificar se variáveis como a idade avançada, apresentação de microfilarémia, valores de d-dímero elevados ou animais em estádios avançados de doença constituíam factores de mau prognóstico para a população avaliada.

Foram analisadas as fichas clínicas de 43 cães diagnosticados com dirofilariose cardiopulmonar que realizaram um ou mais dos seguintes exames complementares: radiografia torácica, hemograma, análises bioquímicas e doseamento do d-dímero. Realizou-se ainda o estadiamento dos indivíduos em classes de 1 a 4 recorrendo à combinação de todos os achados clínicos.

Registou-se uma prevalência de dirofilariose cardiopulmonar canina de 60% no concelho de Benavente. Dos 43 cães diagnosticados, 44% encontravam-se assintomáticos. Ao exame físico, o achado mais comum foi a existência de um sopro cardíaco, seguido de letargia, dispneia e palidez das mucosas. Os sintomas mais frequentemente exibidos foram a tosse, registada em 30,2% dos animais e intolerância ao exercício, verificada em 20,9% dos indivíduos.

Os achados clínicos mais relevantes foram a cardiomegália, o aumento das enzimas hepáticas ALT e AST, leucocitose, neutrofilia, eosinofilia e trombocitopénia no hemograma. Dos animais que efectuaram o doseamento do d-dímero, 45% apresentaram valores acima do valor de referência estipulado ( $> 0,4$  mg/L).

Para a pesquisa de factores de mau prognóstico na população em estudo, apenas foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um estágio  $\geq 3$  e a morte ( $p=0,016$ ).

Globalmente os achados clínicos foram ao encontro do que está descrito na literatura. Neste estudo, verificou-se uma expressão superior de padrões pulmonares mistos e do aumento das enzimas hepáticas e uma menor frequência de eosinofilia e basofilia.

Palavras-chave: Dirofilariose cardiopulmonar canina, *Dirofilaria immitis*, prevalência, exames complementares, prognóstico, Portugal.

## **Abstract**

### **Clinical and epidemiologic characterization of canine cardiopulmonary dirofilariasis in the county of Benavente, Portugal**

The county of Benavente is located in a hyperendemic area of canine heartworm disease. The present study aimed at the registration of the most significant clinical features in infected dogs and the identification of variables such as ageing, microfilaremia, high d-dimer values or advanced clinical stages of disease as poor prognosis factors for the evaluated population.

The clinical files of 43 dogs diagnosed with heartworm disease were analyzed and the individuals were scanned with one or more of the following exams: thoracic radiography, serum biochemical profile, hemogram and measurement of plasma d-dimer levels. The combined clinicopathological findings were used to categorize the individuals in classes from grade 1 to 4.

It was found a prevalence of 60% of canine heartworm disease in Benavente's county. From the total 43 diagnosed dogs, 44% were asymptomatic. During the physical examination, the most frequent findings were the presence of a heart murmur, followed by lethargy, dyspnea and pallor. The most common symptoms were cough registered in 30.2% of the animals and exercise intolerance shown by 20.9% of the individuals.

The most relevant clinical findings were cardiomegaly, elevation of ALT and AST hepatic enzymes, leucocytosis, neutrophilia, eosinophilia and thrombocytopenia. From those which performed the measurement of plasma d-dimer levels, 45% showed values above the stated reference value ( $> 0,4$  mg/L).

For the search of poor prognosis factors in the studied population it was found a single association between a class  $\geq 3$  and the animal death ( $p=0,016$ ).

The clinical findings were mainly concordant with the literature. In this study, there was a higher expression of mixed pulmonar patterns and elevated hepatic enzymes and a decreased frequency of eosinophilia and basophilia.

**Keywords:** Canine heartworm disease, *Dirofilaria immitis*, prevalence, complementary exams, prognosis, Portugal.



## Índice Geral

Declaração relativa à ortografia empregue .....	i
Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas.....	ix
Índice de abreviaturas e símbolos .....	x
I. Relatório do estágio clínico .....	1
II. Introdução .....	3
III. Revisão bibliográfica .....	4
1. Taxonomia e morfologia de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	4
2. Ciclo biológico.....	4
2.1. Hospedeiro intermediário .....	4
2.2. Hospedeiro definitivo .....	5
2.3. Descrição .....	6
3. <i>Wolbachia pipientis</i> .....	7
4. Epidemiologia .....	8
5. Fisiopatologia .....	11
5.1. Síndromes específicas .....	12
6. Sinais clínicos .....	13
7. Diagnóstico .....	14
7.1. Detecção de antígeno .....	14
7.2. Detecção de microfilárias .....	15
7.2.1. Exame a fresco de uma gota de sangue .....	15
7.2.2. Técnicas de enriquecimento .....	15
7.2.2.1. Teste Modificado de Knott .....	15
7.2.2.2. Método de centrifugação de tubo microhematócrito .....	16
7.2.2.3. Teste de filtração .....	16
7.2.2.4. Coloração histoquímica .....	16
7.3. PCR .....	17
8. Exames complementares de diagnóstico .....	17
8.1. Hemograma e perfil de coagulação .....	17
8.2. Análises bioquímicas .....	18
8.3. Urianálise .....	18
8.4. Biomarcadores .....	18
8.4.1. Troponinas .....	19
8.4.2. Mioglobina .....	19
8.4.3. Proteínas de fase aguda .....	19
8.4.4. Endotelina-1 .....	20
8.4.5. Péptidos natriuréticos .....	20
8.4.6. D-dímero .....	20
8.4.7. Aplicação dos biomarcadores no estadiamento da DCC .....	21
8.5. Radiografia .....	22
8.6. Ecocardiografia .....	23
8.7. Electrocardiograma .....	25
9. Estadiamento .....	25
10. Tratamento .....	27

10.1. Protocolo recomendado pela AHS (2018) .....	27
10.2. Doxíciclina .....	28
10.3. Terapêutica microfilaricida .....	29
10.3.1. Lactonas macrocíclicas .....	29
10.4. Terapêutica adulticida .....	30
10.4.1 Dihidroclorato de Melarsomina .....	31
10.5. Patologia associada à morte das filárias .....	32
10.6. Terapêutica de suporte .....	33
10.6.1. Corticosteróides .....	33
10.6.2. Agentes antitrombóticos .....	33
10.6.3. Anti-inflamatórios não esteróides .....	34
10.7. Remoção cirúrgica dos nemátodes adultos de <i>D.immitis</i> .....	34
10.8. Protocolos de tratamento alternativos .....	35
11. Prognóstico .....	36
12. Profilaxia .....	37
<b>IV. Caracterização clínica e epidemiológica da dirofilariose cardiopulmonar canina no concelho de Benavente, Portugal .....</b>	<b>39</b>
1. Objectivos .....	39
2. Material e métodos .....	39
2.1. População em estudo .....	39
2.2. Protocolo de tratamento .....	40
2.3. Corticosteróides .....	41
2.4. Exames complementares .....	42
2.5. Análise estatística .....	42
3. Resultados .....	42
3.1. Variáveis em estudo .....	42
3.2. Medicação de suporte cardio-respiratório e hepático .....	46
3.3. Complicações no decorrer do tratamento .....	46
3.4. Estadiamento .....	47
4. Discussão .....	48
5. Conclusão .....	54
<b>V. Bibliografia .....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo I (Tabela descritiva de todos os casos clínicos incluídos no estudo) .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo II (Radiografias torácicas de alguns dos casos estudados) .....</b>	<b>66</b>

## Índice de figuras

Figura 1 – Registo fotográfico de algumas cirurgias acompanhadas durante o estágio curricular .....	2
Figura 2 – Representação ilustrativa do ciclo biológico de <i>D. immitis</i> no cão .....	7
Figura 3 - Mapa de distribuição de <i>D. immitis</i> na população canina em Portugal .....	9
Figura 4 – Comparação da distribuição geográfica da dirofilariose canina na Europa .....	10
Figura 5 – Observação ao MO de características morfológicas diferenciadoras entre <i>D. immitis</i> , <i>D. repens</i> e <i>A. reconditum</i> utilizando o TMK .....	16
Figura 6 - Radiografia torácica de cão infectado com dirofilariose cardiopulmonar .....	23
Figura 7 - Ecocardiografia de cão infectado com dirofilariose cardiopulmonar .....	24
Figura 8 – Eficácia comprovada das lactonas macrocíclicas e dihidroclorato de melarsomina sobre os estádios de desenvolvimento larvar de <i>D. immitis</i> .....	28
Figura 9 - Exemplo de confinamento em canil para restrição de exercício físico após início da terapêutica adulticida .....	41
Figura 10 – Microfilária detectada em nódulo subcutâneo .....	43

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Estadiamento da dirofilariose cardiopulmonar canina .....	26
<b>Tabela 2</b> – Dose preventiva, terapêutica e tóxica de duas lactonas macrocíclicas utilizadas no tratamento da DCC .....	30
<b>Tabela 3</b> - Formas comerciais das lactonas macrocíclicas disponíveis para a prevenção da DCC em Portugal .....	38
<b>Tabela 4</b> – Sinais clínicos detectados ao exame físico e sintomas reportados em consulta	44
<b>Tabela 5</b> – Resultados dos exames complementares realizados .....	45
<b>Tabela 6</b> – Valores independentes de todos os doseamentos de d-dímero efectuados ao longo do tratamento .....	46

## Índice de abreviaturas e símbolos

% - percentagem

± - mais ou menos

µg – micrograma

AHS – American Heartworm Society

AINE – anti-inflamatório não esteróide

ALP – fosfatase alcalina

ALT – alanina aminotransferase

AS – aparentemente saudáveis

AST – aspartato aminotransferase

BID – *bis in die* (duas vezes por dia)

BNP – Péptido Natriurético do tipo B

CID – coagulação intravascular disseminada

CS – clinicamente suspeitos

DCC – dirofilariose cardiopulmonar canina

ECG – eletrocardiograma

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*

EOD – every other day

ET-1 – Endotelina 1

EV – via endovenosa

HD – hospedeiro definitivo

HI – hospedeiro intermediário

HP – hipertensão pulmonar

ICD – insuficiência cardíaca direita

IL – interleucina

IM – intramuscular

kg – kilograma

LM – lactona macrocíclica

mg – miligrama

mL – mililitro

MO – microscópio ótico

NT-proBNP – fragmento inativo do péptido natriurético

PCR – *polymerase chain reaction*

PO – *per os*

q – cada...

rpm – rotações por minuto

SID – *semel in die* (uma vez por dia)

SVC – síndrome da veia cava

TMK – teste modificado de Knott

TP – tromboembolismo pulmonar

TRC – tempo de repleção capilar

VC – veia cava

VD – ventrículo direito

$\alpha$  – alfa

$\gamma$  – gama



## **I. Relatório do estágio clínico**

O estágio curricular, realizado no último semestre do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, decorreu na clínica de animais de companhia, VetSam, em Samora Correia, sob a orientação do Dr. Frederico Alves Inácio. Entre Agosto de 2017 e Janeiro de 2018 foram cumpridas aproximadamente 1300 horas, onde houve a oportunidade de participar em todas as áreas de intervenção clínica. Por norma, as actividades diárias iniciavam-se no internamento, onde auxiliava a enfermeira veterinária nas mais variadas tarefas de instituição de terapêuticas, alimentação, mudança de pensos, mudança de cateteres, limpeza dos animais, instalações e passeios. Graças ao trabalho no internamento foram desenvolvidas competências de avaliação e identificação de alterações no estado clínico dos internados e uma maior noção da evolução e acompanhamento dos casos diariamente.

Tipicamente existiam várias cirurgias por dia, concentradas na parte da manhã, onde tivemos a oportunidade de colocar cateteres endovenosos, administrar pré-medicação anestésica, realizar a tricotomia e assepsia dos animais, efectuar entubação endotraqueal, monitorizar o plano anestésico, participar como circulante ou ajudante de cirurgião e acompanhar os animais durante o período pós-cirúrgico. Assistimos a uma grande variedade de cirurgias, nas quais se incluem ovariectomias, orquiectomias, mastectomias, cesarianas, redução de hérnias, redução de fraturas, amputação de membro, correcção de luxação patelar e ruptura ligamentar, extirpação de neoplasias, enucleação, cistotomia, gastrotomia, enterotomia, ablação do canal auditivo externo, extracções dentárias, destarizações, procedimentos endodônticos e colocação de aparelhos ortodônticos ativos e passivos. Foi-nos ainda dada a oportunidade de realizar castrações, esterilizações e destarizações com a supervisão e auxílio do médico veterinário responsável.

No laboratório foram observadas citologias obtidas, entre outras, para o diagnóstico de patologias dermatológicas ou suspeitas tumorais, onde efectuei a pesquisa de células tumorais com características de malignidade. Outras actividades desenvolvidas foram a coloração de lâminas com Diff-Quick, realização do exame a fresco de uma gota de sangue, preparação e visualização de esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemoparasitas ou alterações morfológicas celulares, realização de exame de urina tipo II e hemograma e bioquímicas em equipamento da clínica.

Na área da imagiologia acompanhámos diversas ecografias e biópsias eco-guiadas, sobretudo exploratórias da área abdominal, mas também de diagnóstico gestacional ou patologia reprodutiva e algumas ecocardiografias. Foram realizadas radiografias variadas, desde detecção de displasia de anca até situações de emergência. Acompanhei a

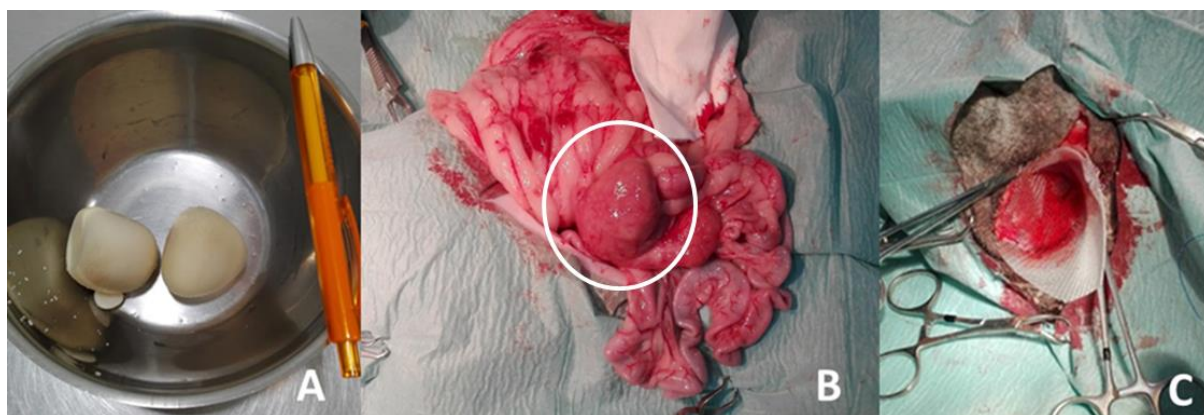


realização de mielografias, radiografias de trânsito baritado e uretrocistografia de contraste duplo. Relativamente a outros exames complementares, efectuámos e/ou auxiliámos à realização de electrocardiogramas, procedendo à leitura de alguns com a ajuda da Dra. Rita. Auxiliámos ainda em actividades de fisioterapia com recurso à manipulação manual e aos ultrassons.

Em ambiente de consultório foram realizadas a anamnese com registo na ficha clínica dos animais, exames físicos completos, procedimentos como colheita de sangue, testes de diagnóstico rápido, colheita de amostras para exame dermatológico, limpeza de feridas, medição da pressão arterial, administração de soro subcutâneo, administração de vacinas e outros injectáveis, aplicação de desparasitantes externos e internos, acompanhamento de visitas aos internados e entrega dos animais aos seus tutores após procedimentos cirúrgicos com explicação da alta clínica.

Ao longo do período de estágio foram internados vários animais com doenças infecciosas, maioritariamente cães com Parvovirose e Coronavirose e gatos com Vírus da Imunodeficiência Felina, Leucemia Felina e Panleucopénia. Para além destas, as doenças e as respectivas patologias com que houve mais contacto foram a lipidose hepática, doenças do trato urinário inferior, insuficiência renal aguda e crónica, insuficiência cardíaca, endocrinopatias e dirofilariose cardiopulmonar canina. Na sequência do internamento dos animais, era-me requisitada a elaboração de um plano de tratamento pelo médico veterinário responsável pelo caso, seguido da discussão do mesmo.

**Figura 1** – Registo fotográfico de algumas cirurgias acompanhadas durante o estágio curricular. (Original)



Legenda: A. Cálculos urinários removidos através de cistotomia, de uma cadela. B. Linfoma intestinal (círculo branco) presente num gato da raça Sphynx. C. Herniorrafia perineal com aplicação de rede protética num cão.

## II. Introdução

A Dirofilariose Cardiopulmonar Canina (DCC) é uma doença hiperendémica em Portugal, de elevada importância clínica, que afecta cães de todas as idades, raças e sexos. A sua prevalência mundial está a aumentar em áreas geográficas previamente consideradas de baixo risco devido a alterações climáticas e factores antropológicos, sendo expectável uma exposição à infecção cada vez maior. Pode assumir um carácter crónico e progressivo à medida que o animal envelhece, mas é igualmente capaz de provocar a morte súbita em indivíduos jovens (Simón et al., 2012; Alho, A., 2017).

A escolha do tema da presente dissertação deveu-se ao facto de na clínica de animais de companhia onde a autora realizou o seu estágio curricular, se verificar uma elevada casuística de DCC. Enquanto tutora, família de acolhimento temporário de cães errantes do concelho de Benavente e no desenvolvimento de actividades junto do Canil Municipal de Benavente, a autora apercebeu-se do elevado número de animais infectados com esta doença na última década.

No concelho de Benavente foi encontrada uma prevalência de 34,2% (Cruz, R., 2012) de DCC e no distrito de Santarém uma prevalência global de 13,2% (Alho et al., 2013). Considerando os riscos envolvidos no tratamento desta doença é imperativo ajustar os protocolos terapêuticos ao quadro clínico de cada indivíduo, efectuando uma caracterização clínica com o maior detalhe possível. O exame complementar que fornece informação clínica de maior relevância para a avaliação das lesões produzidas pela DCC continua a ser a radiografia torácica (Ware, 2014). No entanto, a crescente utilização de biomarcadores como o d-dímero na monitorização do risco de ocorrência de tromboembolismos constitui uma valiosa ferramenta de auxílio para o clínico ao longo do tratamento (Carréton et al., 2013b).

O presente estudo analisa os quadros clínicos de DCC que surgiram à consulta, contribuindo para um conhecimento mais aprofundado das alterações que a doença provoca nos animais.

Os resultados obtidos poderão ser divulgados aos tutores dos cães residentes no concelho de Benavente enquanto reforço do conhecimento da dirofilariose nesta zona e de mais uma evidência científica da importância da sua profilaxia.

### III. Revisão bibliográfica

#### 1. Taxonomia e morfologia de *Dirofilaria immitis*

A primeira referência à dirofilariose canina data de há cerca de 400 anos, em 1626, com as observações de Birago em cães de caça no norte da Itália. Todavia, apenas em 1856, se descreveu este parasita a nível morfológico, sendo nomeado por Leidy como “*immitis*”. As dirofilárias são nemátodes pertencentes à superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, género *Dirofilaria*, dividido em dois subgéneros, *Dirofilaria* (*D. immitis*) e *Nochtiella* (*D. repens*, *D. tenuis* e *D. ursi*) (Simón et al., 2012; Alho et al., 2014).

As formas pré-larvares L1 em circulação, as microfilárias, medem 290-330 µm de comprimento, 5 -7 µm de diâmetro e apresentam uma extremidade cefálica afunilada e uma cauda reta e pontiaguda. A fêmea adulta de *D. immitis* mede 250-300 mm de comprimento e 1-1,3 mm de diâmetro. O macho adulto, de menores dimensões, mede 120-200 mm de comprimento, 0,7-0,9 mm de diâmetro e apresenta uma extremidade posterior em forma de espiral, que auxilia na cópula. Os adultos podem viver mais de 7 anos e as microfilárias até 2 anos (Morchón et al., 2012; Simón et al., 2012).

As vias metabólicas de aquisição de nutrientes variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do nemátode. Os adultos possuem um trato digestivo funcional, ao contrário das microfilárias; e o das L3 está inactivado nos vetores mas torna-se funcional no hospedeiro vertebrado. Nos adultos a nutrição realiza-se através do trato digestivo e da cutícula, ao passo que nas microfilárias este processo é exclusivamente transcuticular (Bowman & Atkins, 2009; Simón et al., 2012).

#### 2. Ciclo biológico

*D. immitis* possui um ciclo de vida heteroxeno e indirecto, dividido em cinco estádios larvares, três dos quais ocorrem num hospedeiro intermediário (HI) obrigatório (artrópode picador da família Culicidae) e os dois restantes num hospedeiro definitivo (HD) vertebrado (Simón et al., 2012; Alho et al., 2014).

##### 2.1. Hospedeiro intermediário

A transmissão de *D. immitis* pode ocorrer por mais de 70 espécies de mosquitos culicídeos dos géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia* e *Culiseta*, embora os vectores mais importantes devam pertencer provavelmente a menos de 15 espécies diferentes (Simón et al., 2012; Atkins, 2017).

No primeiro estudo de identificação molecular de vectores de *D. immitis* em Portugal continental, foram capturados 9156 mosquitos fêmea, em três estações do ano diferentes (Verão, Outono e Primavera), nos distritos de Coimbra, Setúbal e Santarém. Do total, 5866 exemplares foram sujeitos à análise de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), tendo sido identificados como potenciais vectores 6 espécies de mosquito: *Culex theileri*, *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles atroparvus*, *Aedes caspius* e *Aedes detritus*. *Culex theileri* foi a espécie mais abundante em Santarém, seguida de *Culex pipiens*. Durante o estudo de dois anos foram efectuadas colheitas de mosquitos em 6 datas distribuídas por várias estações do ano, tendo sido encontrados mosquitos infectantes em 5 das mesmas. Existe assim uma forte possibilidade da existência de uma presença contínua de vectores infectantes ao longo de todo o ano, particularmente em Santarém (Ferreira et al., 2015).

Os culicídeos têm duas asas e medem entre 2-10 mm de comprimento. Apenas as fêmeas são hematófagas, possuindo uma probóscide adaptada à perfuração e sucção, produzindo substâncias anticoagulantes para facilitar a refeição. Utilizam estímulos químicos e térmicos para detectar o seu hospedeiro e, após a alimentação, fazem a ovopostura na superfície da água. A maturação larvar depende da temperatura exterior, tendo sido demonstrado que o tempo necessário para o desenvolvimento de *D. immitis* nos mosquitos (*Aedes spp.*, *Culex spp.* e *Anopheles spp.*), desde microfilária até L3, é de 8-10 dias a 28–30°C, 11-12 dias a 24°C, 16–20 dias a 22°C, tendo-se estabelecido 14°C como o limiar para o desenvolvimento larvar (Cancrini & Gabrielli, 2007; Alho et al, 2014).

## 2.2. Hospedeiro Definitivo

*D. immitis* apresenta uma baixa especificidade para hospedeiros vertebrados, podendo infectar diversas espécies de mamíferos: raposas (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*), coiotes (*Canis latrans*), furões (*Mustela putorius*), cavalos (*Equus caballus*), leões-marinhos (*Zalophus californianus*) e castores (*Castor canadensis*), sendo a microfilarémia rara nestes hospedeiros. Os hospedeiros definitivos (HD) de *D. immitis* são os canídeos domésticos (*Canis familiaris*), que funcionam como hospedeiro reservatório da doença, e acidentalmente os felinos e humanos. Nos gatos, a maioria das larvas inoculadas não matura e as que sobrevivem demoram em média 7 a 8 meses a chegar ao estágio de adultos. Em infecções naturais estão presentes entre um a oito nemátodes adultos que habitualmente não produzem microfilárias e possuem uma esperança média de vida de 3 a 4 anos, embora aproximadamente metade dos gatos infetados elimine a infecção sem tratamento em 3 anos. A infecção por *D. immitis* em humanos é tipicamente caracterizada pela formação de nódulos pulmonares provocados pela resposta inflamatória desencadeada por nemátodes adultos imaturos localizados na vasculatura pulmonar. No entanto, foram já encontradas larvas de *D. immitis* no tecido conjuntival, adiposo, hepático, intraocular, mesentérico e

cranial, bem como nas artérias testiculares. Deste modo, o conceito tradicional de que a infecção por *D. immitis* está associada exclusivamente à formação de nódulos pulmonares e a infecção por *D. repens* aos nódulos subcutâneos e localizações oculares deve ser questionado. Da mesma forma novas evidências sugerem a mudança do paradigma de que as infecções em humanos são esporádicas e acidentais, tendo sido registado um número crescente de casos diagnosticados nos últimos anos (Bowman & Atkins, 2009; Simón et al., 2012; Alho et al, 2014).

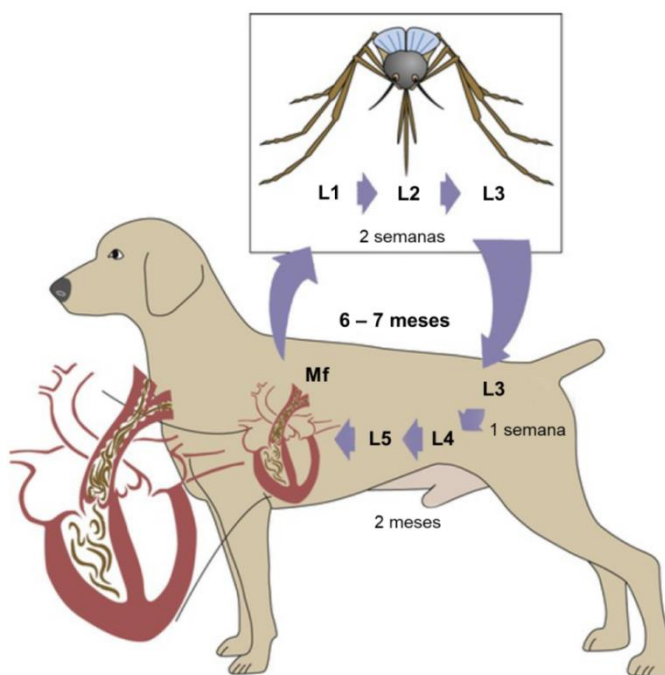
### 2.3. Descrição

Os nemátodes adultos de *D.immitis* localizam-se na árvore vascular pulmonar do HD e, quando a carga parasitária é muito elevada, no ventrículo e átrio direitos, veia cava e veia hepática. No caso da presença de adultos de ambos os sexos, é iniciada a cópula e as fêmeas adultas após fecundação libertam microfilárias na circulação sanguínea (Simón et al., 2012; Alho et al., 2014).

As microfilárias estão variavelmente presentes nos cães infectados e têm periodicidade diurna e sazonal, com maiores números a aparecer no sangue periférico durante o anoitecer e no verão (Atkins, 2017).

As microfilárias são ingeridas pelas fêmeas de mosquito que se alimentam num canídeo infectado. Nas 24 horas seguintes alcançam os túbulos de Malpighi, onde sofrem uma muda para a forma larvar L2 em 8-10 dias pós-infecção (dpi) e de L2 para L3 nos 3 dias seguintes. As L3 infetantes migram para o aparelho bucal do vector e, durante a refeição de sangue do mosquito, são depositadas numa gota de saliva na pele do HD. Para penetrar nos tecidos conjuntivos e planos musculares utilizam a solução de continuidade originada pela picada. No máximo são transmitidas 10 a 12 L3 ao HD. A muda para L4 ocorre 3 a 12 dpi no tecido subcutâneo, adiposo e músculo-esquelético, terminando com uma muda final para L5 (adulto imaturo) a ocorrer 50 a 70 dias após a infecção. Estes adultos imaturos têm 1 a 2 cm de comprimento e atingem o coração através da circulação venosa, passando as artérias pulmonares onde se fixam definitivamente entre 70 a 85 dpi. Aos 120 dpi, atingem a maturidade e reproduzem-se para iniciar um novo ciclo. Sob condições óptimas, o ciclo de vida completa-se em 184 a 210 dias (Figura 2). O HD pode tornar-se microfilarémico a partir dos 6 meses após a infecção. Alguns canídeos são amicrofilarémicos, possivelmente devido a factores como infecção por um único sexo, imaturidade das fêmeas ou resposta imune do hospedeiro (Simón et al., 2012; Alho et al., 2014).

**Figura 2** – Representação ilustrativa do ciclo biológico da *D. immitis* no cão (Adaptado de Atkins, 2017).



### 3. *Wolbachia pipientis*

*Wolbachia pipientis* é uma bactéria intracelular gram-negativa presente em dois grupos zoológicos distintos: os artrópodes terrestres e os nemátodes filarídeos. Foi observada pela primeira vez em 1924, por Hertig e Wolbach, nas células reprodutivas do mosquito *Culex pipiens*. As primeiras observações de bactérias intracitoplásmicas em filarídeos foram efectuadas em *D. immitis* em meados de 1970, mas a sua identificação enquanto *Wolbachia* só se concretizou vinte anos mais tarde (Ferri et al., 2011; Simón et al., 2012).

As bactérias do género *Wolbachia* estão presentes em todos os estádios larvares no vector hematófago e no hospedeiro vertebrado, localizando-se no sistema reprodutivo feminino e nas células hipodérmicas dos cordões laterais em ambos os sexos de *D. immitis*. A sua transmissão à descendência dá-se através do citoplasma dos ovos (Martin & Gavotte, 2010; McHaffie, 2012).

A natureza obrigatória da relação simbiótica existente entre filárias e *Wolbachia* ficou demonstrada ao se verificar a interrupção de processos como embriogénese, mudas dos estádios larvares e crescimento das formas adultas, após a realização de antibioterapia adequada (McHaffie, 2012). Mais ainda, a curva de crescimento de *Wolbachia* atinge o seu pico durante a primeira semana de infecção no hospedeiro vertebrado, quando as microfilárias se encontram nos estádios L3 e L4. O período de maior crescimento da população bacteriana corresponde assim ao primeiro mês de infecção no hospedeiro definitivo, evidenciando a sua importância nos períodos metabolicamente mais desafiantes para as dirofilárias (Taylor et al., 2005).

Projectos de sequenciação do genoma bacteriano demonstraram também a importante função que este microrganismo desempenha na biossíntese de moléculas que as filárias aparentam ser incapazes de produzir *de novo*. Do mesmo modo, foram identificados metabolitos providenciados à *Wolbachia* pelo seu hospedeiro nemátode, confirmando a existência de uma dependência metabólica mútua (Taylor et al., 2012).

Diversos estudos apontam para uma elevada prevalência do simbionte na população de *D. immitis*, utilizando a técnica de PCR para detectar ADN bacteriano em amostras sanguíneas de cães infectados. Rossi et al., (2010) registaram uma prevalência de 100% numa amostra de 13 cães infectados com *D. immitis*, no Brasil. Em Espanha, Tabar et. al. (2013) detectaram ADN de *Wolbachia* em 15 cães, num total de 49 animais infectados. No primeiro estudo realizado em Portugal, Landum et al. (2014) encontraram uma prevalência de 52,6% numa população de 38 cães positivos para *D. immitis*, não tendo sido detectado ADN de *Wolbachia* nos animais com infecção oculta.

Lee et al. (2008b) extraíram 200 dirofilárias adultas de uma amostra de 40 cães provenientes de diferentes províncias da Coreia e verificou que todos os nemátodes continham ADN de *Wolbachia*.

Diversos factores podem conduzir à libertação de *Wolbachia* na corrente sanguínea: morte das filárias, atrito nas paredes dos vasos sanguíneos, mudança dos estádios larvares, libertação de microfilárias pelos nemátodes adultos ou aquando da instituição de terapêutica filaricida (Taylor et al., 2005).

A circulação livre da bactéria está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de neutrófilos e a um aumento de imunoglobulinas específicas. Estes efeitos devem-se em grande parte a uma proteína de superfície bacteriana – *Wolbachia Surface Protein* - que promove a produção de Interleucina (IL) - 8, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , IL-12 e Interferão- $\gamma$ . No entanto foram já identificadas outras moléculas e proteínas bacterianas capazes de gerar uma resposta inflamatória (Dingman et al., 2010).

Considerando o processo inflamatório desencadeado pela circulação livre da *Wolbachia* e a sua relação simbiótica com *D. immitis*, a inclusão de antibioterapia adequada no protocolo de tratamento da dirofilariose é reconhecida como uma medida fundamental para obter o melhor prognóstico possível (Martin & Gavotte, 2010).

#### **4. Epidemiologia**

A dirofilariose canina encontra-se distribuída um pouco por todo o mundo, sobretudo em zonas com humidade e temperatura moderada a elevada durante, pelo menos, uma parte do ano. Foi encontrada em todos os 50 estados dos Estados Unidos da América e é endémica nos países do sudoeste europeu, como Portugal, Espanha, Itália e França. Os

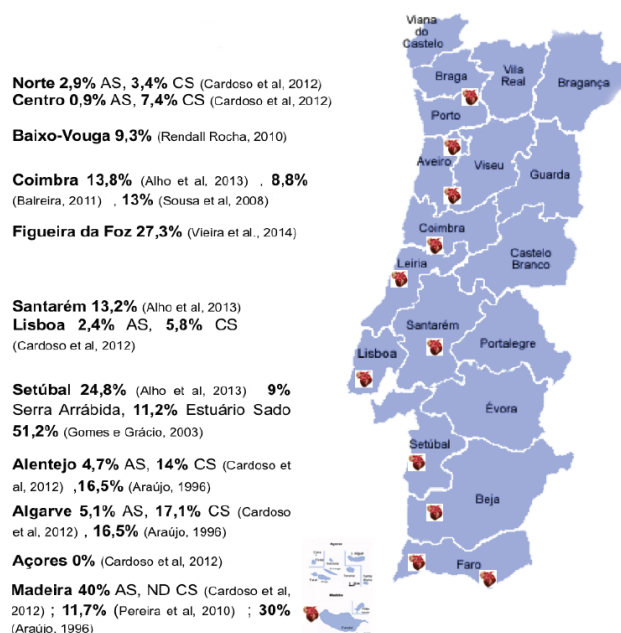
países do este e centro europeu reportaram alguns casos de DCC e os países nórdicos são ainda considerados livres da doença (Bowman et al., 2009; Alonso & Gómez, 2012; Morchón et al., 2012).

A infecção por *D. immitis* é endémica/hiperendémica em Portugal, sendo uma das doenças parasitárias do cão com maior relevância no país. As bacias fluviais do Tejo, Douro, Sado, Mondego e a ilha da Madeira são focos importantes da doença. Na figura 3 estão representadas as prevalências encontradas por vários autores em diferentes áreas do país. Alho et al., (2013) registaram a maior prevalência em Setúbal (24,8%), seguida de Coimbra (13,8%) e Santarém (13,2%), observando-se uma prevalência média global de 15,1%.

Cardoso *et al.*, (2012) observaram prevalências de 2,9% e 3,4% na zona Norte; 0,9% e 7,4% no Centro; 2,4% e 5,8% Lisboa; 4,7% e 14% Alentejo; 5,1% e 17,1% Algarve; 0% nos Açores; e 40% e não determinado na Madeira, nos cães aparentemente saudáveis (AS) e clinicamente suspeitos (CS) de doenças transmitidas por vetores, respetivamente.

A prevalência da dirofilariose canina está a aumentar em todo o globo. Na Europa observa-se uma alteração no padrão de distribuição da doença, com um crescimento das zonas hiperendémicas (bacia Mediterrânica) para o Norte e Leste Europeu (Figura 4) (Simón et al., 2012; Morchón et al., 2012; Alho et al., 2014).

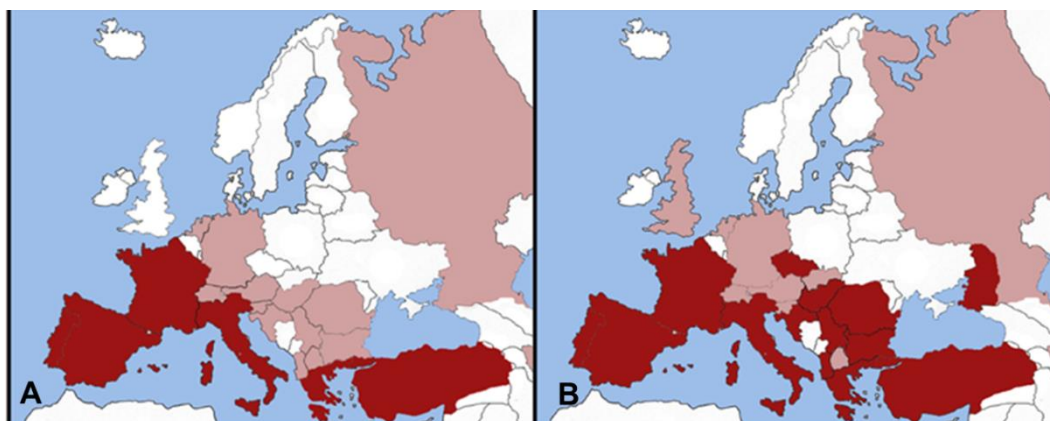
**Figura 3** - Mapa de distribuição de *D. immitis* na população canina em Portugal (Adaptado de Alho et al., 2014).



Legenda: AS – animais aparentemente saudáveis. CS – clinicamente suspeitos de doenças transmitidas por vetores.



**Figura 4** – Comparação da distribuição geográfica da dirofilariose canina na Europa. (Adaptado de Morchón et al., 2012).



Legenda: A – Distribuição geográfica até 2001. B – Distribuição entre 2001 e 2011. As áreas endêmicas estão representadas a vermelho e os relatos de casos esporádicos a rosa.

As modificações ambientais, tanto naturais quanto as resultantes da actividade humana, e a migração ou trânsito livre de animais têm aumentado o potencial de infecção por *D. immitis*. A expansão imobiliária em áreas não-endêmicas e áreas de baixa incidência da doença tem gerado uma maior disseminação e aumento da prevalência da dirofilariose, devido a alterações no sistema de drenagem de terrenos não urbanizados, criando novas fontes de água em complexos urbanos. Esta expansão levou à formação de ilhas de calor urbanas, uma vez que edifícios e estacionamento retêm muito calor durante o dia, criando microambientes que permitem uma maturação mais rápida das larvas nos mosquitos, conduzindo a um aumento do número e distribuição geográfica dos vetores capazes de transmitir a doença. Ainda devido a este fenómeno de conservação de calor em microambientes urbanos, o risco de transmissão de dirofilariose no Inverno nunca é eliminado (Alho et al., 2014; AHS, 2018).

A emergência de novas espécies de mosquitos vectores competentes contribui também para a disseminação desta parasitose. O mosquito *Aedes albopictus*, nativo do sudeste Asiático e Pacífico ocidental, disseminou-se pela Europa, África e América nas últimas décadas, e é uma espécie altamente adaptável, de comportamento antropofílico agressivo (30-48 picadas por hora) (Cancrini et al., 2003; Alho et al., 2014). No âmbito do programa de vigilância entomológica desenvolvido pela Rede de Vigilância de Vetores, esta espécie foi identificada pela primeira vez na região Norte de Portugal em 2017 e na região do Algarve em 2018 (Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, 2017 & 2018). O vector do dengue e febre-amarela, *Aedes aegypti*, foi também identificado em Portugal, na Ilha da Madeira (Alho et al., 2014).

Outros factores importantes que justificam o aumento do número de casos de dirofilariose canina são o aparecimento de resistências aos insecticidas e o aumento da esperança média de vida de hospedeiros silvestres sentinela, devido a programas de profilaxia para a raiva por exemplo (Simón et al., 2012; Alho et al., 2014).

A duração da estação de transmissão da dirofilariose é essencialmente dependente da quantidade de calor necessário para permitir o desenvolvimento da larva infectante no mosquito (AHS, 2018). Alho et al. (2014) avaliaram o risco de transmissão de dirofilariose canina em Portugal, estimando o número de dias com temperaturas compatíveis com o desenvolvimento larvar. As regiões com maior número de dias de condições adequadas à transmissão foram a Madeira com uma média de 209,9 dias/ano, seguida de Faro com 175,2 dias/ano, Lisboa 163,5 dias/ano, Açores 140 dias/ano e Porto 117,2 dias/ano. Um período de risco sazonal para a dirofilariose variou desde 5 meses/ano no Porto, 5,6 meses/ano nos Açores, 6,4 meses/ano em Lisboa, 6,9 meses/ano em Faro e 8 meses/ano na Madeira.

## **5. Fisiopatologia**

Os nemátodes adultos alojam-se preferencialmente na árvore vascular pulmonar caudal, migrando ocasionalmente para as artérias pulmonares principais, coração direito e grandes veias em infecções graves. A gravidade das lesões está relacionada com o número relativo de parasitas (que podem variar entre 1 a mais de 250), a duração da infecção e a interação hospedeiro-parasita. As lesões vasculares começam a desenvolver-se alguns dias após a chegada das larvas (a partir dos 3 meses pós-infecção), com comprometimento endotelial e proliferação vilosa, fibrose e ativação e atração de leucócitos e plaquetas. As lesões proliferativas podem ocluir o lúmen vascular. A dilatação endotelial provoca o afastamento das junções intracelulares e aumenta a permeabilidade da vasculatura pulmonar, podendo desenvolver-se edema perivascular. As larvas mortas provocam uma reacção ainda mais grave, induzindo trombozes, inflamação granulomatosa e inflamação vilosa rugosa. Macroscopicamente, as artérias pulmonares encontram-se aumentadas, de paredes espessadas e tortuosas, com superfícies endoteliais irregulares. No entanto, enfartes pulmonares não são comuns devido à circulação colateral extensiva providenciada ao pulmão e à natureza gradual da oclusão vascular (McCall et al., 2008b; Ware, 2014; Atkins, 2017).

As artérias pulmonares lesadas são funcionalmente incompetentes, resultando numa diminuição da resistência ao exercício. A hipóxia secundária a fenómenos de Tromboembolismo Pulmonar (TP), pneumonia eosinofílica e consolidação pulmonar contribui ainda mais para a vasoconstrição e aumento da resistência vascular pulmonar,

resultando em Hipertensão Pulmonar (HP), aumento da pós-carga ventricular direita, comprometimento do débito cardíaco e consequente desenvolvimento de Insuficiência Cardíaca Direita (ICD). Estes animais manifestam frequentemente intolerância ao exercício, fadiga, dispneia, tosse e síncope ou lipotimias (Kramer, 2006).

Quando crônica, a HP pode ser complicada por regurgitação da tricúspide. A terapêutica adulticida deve ser adiada até ser atingida a estabilização do paciente com recurso a diuréticos, vasodilatadores e inibidores da enzima de conversão da angiotensina (Atkins, 2017).

### **5.1. Síndromes específicas**

Um TP espontâneo ou pós-adulticida constitui a complicação mais importante da DCC. Pode agravar a HP, ICD ou, menos frequentemente, resultar no aparecimento de hemoptise e enfarte pulmonar. Larvas mortas e/ou desintegradas pioram a lesão vascular e potenciam a coagulação. A morte massiva e aguda das larvas associada ao exercício físico provoca o aumento do fluxo arterial com libertação de mediadores inflamatórios no parênquima pulmonar através das artérias gravemente lesadas e permeáveis. A apresentação clínica mais comum é um início súbito de letargia, anorexia, febre e tosse 7 a 10 dias após a terapêutica adulticida, frequentemente após falha na restrição de exercício. O manejo médico passa pelo confinamento em jaula, oxigenoterapia e prednisona. Alguns autores defendem a instituição de fluidoterapia para maximizar a perfusão tecidual e combater a desidratação. A utilização de heparina até à normalização da contagem plaquetária, ácido acetilsalicílico e vasodilatadores permanece controversa (Goggs et al., 2009).

As lesões do parênquima pulmonar também resultam de fenómenos como a pneumonia eosinofílica. A pneumonia eosinofílica ocorre quando as microfilárias cobertas de anticorpos ficam aprisionadas na microcirculação pulmonar e desencadeiam uma reacção inflamatória e imunológica, surgindo numa fase precoce da doença (Atkins, 2017).

Uma forma mais rara de doença do parênquima pulmonar, denominada granulomatose eosinofílica pulmonar, não tem a sua etiologia e patogénese totalmente esclarecidas. Pensa-se que as microfilárias aprisionadas nos pulmões são rodeadas por neutrófilos e eosinófilos, acabando por formar granulomas. É caracterizada por um processo inflamatório nodular mais organizado, associado a linfadenopatia brônquica e ocasionalmente, efusão pleural. Tal como a pneumonite eosinofílica, o tratamento da granulomatose é realizado com recurso à prednisona e pode ser considerada a combinação com ciclofosfamida ou azatioprina com o objectivo de aumentar o efeito imunossupressor. Uma vez que o prognóstico é reservado,

a excisão cirúrgica das lesões lobares tem sido recomendada por alguns autores (Alonso & Gómez, 2012; Atkins, 2017).

A presença de microfilárias circulantes nos capilares glomerulares pode conduzir a um quadro de glomerulonefrite devido à formação e deposição de complexos anticorpo-antígeno. O resultado é proteinúria (albuminúria), raramente associada a insuficiência renal. A maioria dos cães que sofre de dirofilariose crônica tem glomerulonefrite (Grauer, 2001).

Dirofilárias adultas podem ainda migrar passivamente de forma retrógrada das artérias pulmonares para a Veia Cava (VC) e coração direito, produzindo a Síndrome da Veia Cava (SVC). A SVC é tipicamente observada em animais com uma carga parasitária elevada. A migração retrógrada dos adultos para a VC e Átrio Direito (AD) conduz a uma obstrução parcial do fluxo sanguíneo para a câmara direita do coração e insuficiência da válvula tricúspide. A maioria destes animais apresenta também HP pré-existente, que agrava significativamente a regurgitação da tricúspide. Esta combinação de efeitos reduz substancialmente a pré-carga do ventrículo esquerdo e consequentemente o débito cardíaco. Sem tratamento, a morte advém em 24 a 72 horas devido a choque cardiogénico complicado pela anemia, acidose metabólica e Coagulação Intravascular Disseminada (CID). O prognóstico é reservado a não ser que a causa primária – nemátodes adultos no AD e VC – seja removida. Ainda assim, mesmo com a remoção cirúrgica dos parasitas, a mortalidade pode chegar aos 40% (Kramer & Genchi, 2014).

As dirofilárias podem ainda fazer migrações aberrantes. Este fenómeno é pouco frequente e tem sido associado a manifestações oculares e neuromusculares porque têm sido encontradas larvas no tecido muscular, cerebral, espinal medula e câmara anterior do olho. Foi ainda observada a ocorrência de trombose arterial sistémica com parasitas adultos imaturos quando as larvas efectuam migrações erráticas para a bifurcação da aorta ou distalmente para as artérias digitais (Atkins, 2017).

## **6. Sinais clínicos**

Muitos animais infectados com DCC são assintomáticos, com um exame físico normal. Aqueles com doença oculta e os que não são testados rotineiramente têm maior probabilidade de sofrer de lesões arteriais pulmonares graves e sinais clínicos associados à HP, infiltrados do parênquima pulmonar e efeitos cardíacos secundários. Os animais sintomáticos surgem frequentemente com intolerância ao exercício, dificuldade respiratória, síncope ou tosse e ao exame físico verifica-se uma má condição corporal, taquipneia ou dispneia e perda de peso. À auscultação pode ser audível um sopro cardíaco associado à

insuficiência da tricúspide (13%), segundo som cardíaco dividido (13%) e som de galope (Alonso & Gómez, 2012; Ware, 2014; Atkins, 2017).

Às lesões do parênquima pulmonar está associado o aparecimento de tosse e fúrvores e com a granulomatose estão reportados sons pulmonares abafados, dispneia e cianose. Quando ocorrem TP massivos, podem estar presentes adicionalmente sinais de dispneia, febre e hemoptise. Associados à ICD estão sinais como ascite, pulso jugular falso e hepatoesplenomegália e aumento do Tempo de Repleção Capilar (TRC). Relativamente à SVC um início súbito de anorexia, depressão, fraqueza e tosse são acompanhados na maioria dos casos por dispneia e hemoglobinúria. A hemoglobinúria tem sido considerada patognomónica desta síndrome. Ao exame físico observa-se palidez das mucosas, aumento do TRC, pulso fraco, pulso jugular falso, hepatoesplenomegália e dispneia (Ware, 2014; Atkins, 2017;).

## **7. Diagnóstico**

### **7.1. Detecção de antígeno**

Os testes de detecção de antígeno de *D.immitis* são recomendados como o principal método de diagnóstico para a DCC devido à sua elevada especificidade e sensibilidade. Baseiam-se na reacção de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ou em métodos imunocromatográficos sob a forma de testes rápidos. Até há pouco tempo os testes comercialmente disponíveis detectavam apenas os antígenos do trato reprodutivo das fêmeas adultas de *D.immitis* no sangue total, plasma ou soro de cães. Falso-negativos podiam ocorrer perante um número reduzido de fêmeas adultas, quando estavam presentes apenas fêmeas imaturas ou machos e também associados à formação de complexos antígeno-anticorpo. Falso-positivos devem-se essencialmente a erros técnicos na realização do teste (Ware, 2014; AHS, 2018).

Os testes actuais detectam nemátodes de ambos os sexos e infecções com apenas um parasita em qualquer estágio de desenvolvimento com uma especificidade de 100% e sensibilidade próxima dos 95% (Urano Vet SL, 2018).

Os testes ELISA semi-quantitativos têm uma correlação directa mas imprecisa com o número de fêmeas adultas. A sua utilidade na determinação do grau de parasitismo pode ser limitada pelo aumento transitório da antigenémia como consequência de morte parasitária recente (Genchi et al., 2007b). Não obstante são um indicador útil da probabilidade de ocorrência de complicações tromboembólicas, bem como na monitorização da eficácia do tratamento adulticida (Atkins, 2017).

## **7.2. Detecção de microfilárias**

A pesquisa de microfilárias circulantes deve ser sempre realizada uma vez que permite determinar o estado microfilarémico do cão e a adaptação do protocolo de tratamento (animais altamente microfilarémicos têm maior risco de desenvolver reacções adversas nas primeiras administrações de microfilaricida). No entanto, o número de microfilárias circulantes no sangue periférico não apresenta uma boa correlação com o número de nemátodes adultos, pelo que não pode ser utilizado para determinar a gravidade da infecção. De facto, animais altamente microfilarémicos são tipicamente hospedeiros de poucos adultos (Genchi et al., 2007b; Atkins, 2017; AHS, 2018).

A prevalência de infecções amicrofilarémicas em animais não sujeitos a protocolos profilácticos para a *D. immitis* é de 10-20% (Atkins, 2017). As verdadeiras infecções ocultas podem resultar da destruição das microfilárias pelo sistema imunitário do hospedeiro e estão frequentemente associadas a sinais graves de doença, ou pode tratar-se de uma infecção por parasitas de um único sexo (Venco, 2007). Resultados falso-negativos podem dever-se a um número reduzido de microfilárias e/ou a variações diurnas na presença das mesmas na circulação periférica (Ware, 2014).

### **7.2.1. Exame a fresco de uma gota de sangue**

Uma gota de sangue venoso fresco é colocada numa lâmina de microscópio, coberta com lamela e examinada ao Microscópio Ótico (MO). As microfilárias são visíveis através do movimento que provocam ao passar entre os eritrócitos. Este teste permite a observação do padrão de motilidade das microfilárias. Se este for no mesmo local, é indicativo do género *Dirofilaria*. Este teste é barato e rápido, mas apresenta uma baixa sensibilidade, com falsos-negativos frequentes e não permite identificar a espécie de dirofilária (Genchi et al., 2007b).

### **7.2.2. Técnicas de enriquecimento**

As técnicas de enriquecimento concentram as microfilárias circulantes, permitindo um aumento da sensibilidade dos testes e a diferenciação dos nemátodes através de critérios morfológicos.

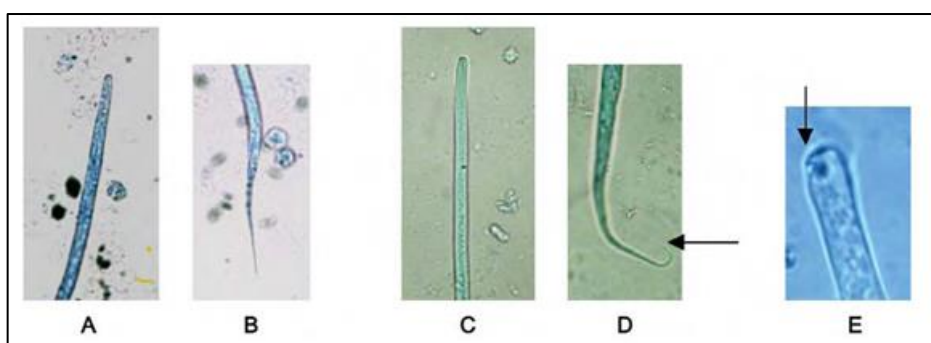
#### **7.2.2.1. Teste Modificado de Knott**

A técnica mais utilizada é o Teste Modificado de Knott (TMK). Neste teste 1 mL de sangue venoso é misturado com 10 mL de uma solução de formalina a 2% e a mistura é centrifugada durante 3-5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante é descartado e o sedimento misturado com uma gota de azul-de-metileno. O sedimento corado é colocado numa lâmina, coberto com lamela e observado ao MO com objetiva de 100x para pesquisa de microfilárias

(Genchi et al., 2007b). Magnis et al., (2013) validaram critérios morfométricos para a identificação de microfilárias no sangue de hospedeiros caninos utilizando o TMK, permitindo uma clara distinção entre *D. immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* e *Acantocheilonema reconditum* (Figura 5). Uma vez que *A. dracunculoides* e *A. reconditum* têm dimensões semelhantes, outros métodos, nomeadamente, moleculares são necessários para distinguir as duas espécies.

Este teste apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, no entanto é moroso e requer um bom conhecimento da morfologia dos microfilarídeos.

**Figura 5** – Observação ao MO de características morfológicas diferenciadoras entre as microfilárias de *D. immitis*, *D. repens* e *A. reconditum* utilizando o TMK (Genchi et al., 2007b).



Legenda: A – Extremidade anterior de *D. immitis* cônica (x400). B – Extremidade posterior de *D. immitis* recta (x1000). C – Extremidade anterior de *D. repens* romba (x400). D – Extremidade posterior de *D. repens* em gancho (x1000). E – Extremidade anterior de *A. reconditum* com gancho cefálico (x1000).

#### 7.2.2.2. Método de centrifugação de tubo microhematócrito

Este método consiste na observação do movimento das microfilárias sob a camada de leucócitos num tubo de microhematócrito após a centrifugação do mesmo (AHS, 2018).

#### 7.2.2.3. Teste de filtração

O teste de filtração compreende a adição de 1 mL de sangue venoso em anticoagulante a 10 mL de solução de lisado. A mistura é injectada na câmara de um filtro (miliporo). O filtro é removido da câmara, colocado numa lâmina, corado e examinado ao MO. É um teste rápido e sensível em cães, mas dispendioso e a solução de lisado encolhe as microfilárias, comprometendo os critérios de medição morfométrica (Genchi et al., 2007b).

#### 7.2.2.4. Coloração histoquímica

1 mL de sangue venoso colhido para um tubo de EDTA é misturado com 10 mL de água desionizada e centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante é descartado e o sedimento colocado numa lâmina e seco à temperatura ambiente. O esfregaço é fixado

com acetona, seco e coberto com substrato de fosfatase ácida. Duas horas depois à temperatura ambiente, a lâmina é coberta com lamela e observada ao MO. As microfilárias de *D. immitis* apresentam dois locais de actividade de fosfatase ácida no poro excretor e no ânus, enquanto *D. repens* tem apenas um junto ao poro anal. Esta técnica é muito específica mas dispendiosa, morosa e requer um operador experiente (Genchi et al., 2007b).

### **7.3. PCR**

A técnica de PCR é uma ferramenta muito sensível e precisa na discriminação de diferentes espécies de filarídeos. É uma técnica recomendada em caso de anomalias morfológicas das microfilárias, frequentes em animais sujeitos a microfilaricidas de forma incorrecta, quando estão presentes mais do que uma espécie de filárias e em contexto de investigação científica. É muito sensível e específica mas utilizada poucas vezes na prática clínica devido ao seu preço elevado, tempo que demora a executar e equipamento e pessoal especializado necessário (Genchi et al., 2007b). Poole et al. (1992) utilizaram um *primer* baseado na sequência de um gene que codifica para um antigénio da cutícula de *D. immitis* com múltiplas repetições em tandem, Latrofa et al. (2012a) desenvolveram um método de PCR *multiplex* em tempo-real para detetar *D. immitis* e diferenciar esta espécie de *D. repens* em cães e mosquitos e Latrofa et al. (2012b) descreveram uma técnica de PCR *multiplex* para a detecção simultânea de diferentes espécies de microfilarídeos em cães.

## **8. Exames complementares de diagnóstico**

Os exames complementares são fundamentais para o estadiamento da doença, instituição de medicação de suporte adequada e estabelecimento de um prognóstico mais preciso. Ao permitirem adaptar o protocolo de tratamento a cada caso individual podem contribuir também para um prognóstico mais favorável. No entanto não servem como meio de diagnóstico da dirofilariose, embora na ecocardiografia seja possível visualizar os nemátodes adultos (Ware, 2014).

### **8.1. Hemograma e perfil de coagulação**

Eosinofilia, basofilia, neutrofilia e monocitose são achados comuns mas inconsistentes (Ware, 2014). Alonso & Gómez (2012) referem que aproximadamente 10% dos cães com um quadro clínico ligeiro e 60% com um quadro grave apresentam uma ligeira anemia normocítica normocrómica. Sensivelmente 20% dos animais infectados demonstram



leucocitose com desvio à esquerda, consequência do aumento da actividade fagocitária dirigida às filárias mortas e das reacções inflamatórias a nível pulmonar (Alonso & Gómez, 2012). Os mesmos autores reportam ainda a presença de eosinofilia em 85% dos cães microfilarémicos e 95% dos amicrofilarémicos devido à destruição imunomediada das microfilárias, e referem que a dirofilariose é a causa mais frequente de basofilia em regiões endémicas.

A ocorrência de trombocitopénia está associada a fenómenos de tromboembolismo e pode resultar do consumo plaquetário no sistema arterial pulmonar, especialmente após o tratamento adúlticida. Cães com SVC podem apresentar hemólise e CID, com alterações concomitantes do perfil de coagulação caracterizadas por prolongamento dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial activada (Alonso & Gómez, 2012; Ware, 2014).

## **8.2. Análises bioquímicas**

As análises bioquímicas estão frequentemente dentro dos parâmetros de referência em infecções simples. Estão descritas elevações ligeiras a moderadas da actividade das enzimas hepáticas (10% dos casos) e hiperbilirrubinémia, sobretudo quando existem sinais de insuficiência cardíaca. Azotémia pré-renal ou secundária a glomerulonefrite avançada ou amiloidose renal estão descritas com uma baixa prevalência, em apenas 5% dos casos. A hipoalbuminémia pode surgir em animais em estádios clínicos mais avançados e associada a doença glomerular grave. A resposta imune às dirofilárias resulta numa gamopatia policlonal, estando descrita a hiperglobulinémia em infecções crónicas. A hemoglobulinémia está frequentemente associada à síndrome da veia cava e menos frequentemente a tromboembolismos (Ware, 2014; Atkins, 2017).

## **8.3. Urinálise**

Proteinúria é comum em animais com infecções crónicas e graves, devendo-se à glomerulonefrite provocada pela deposição de complexos imunes ou amiloidose. A albuminúria está descrita em 10 a 30% dos casos (Ware, 2014). Já a hemoglobínúria está associada à SVC ou à lise associada a TP ou microangiopatias, observadas nos estádios mais avançados (Calvert & Thomason, 2007).

## **8.4. Biomarcadores**

Várias moléculas libertadas na corrente sanguínea após lesão endotelial, perfusão inadequada ou lise de trombos podem servir como marcadores precoces de doença cardiovascular, auxiliando no processo de tomada de decisões terapêuticas (Simón et al.,

2012). Os biomarcadores cardíacos constituem actualmente parte fundamental do diagnóstico e monitorização das doenças cardíacas, sendo de grande interesse na DCC (Yoon et al., 2017).

#### **8.4.1. Troponinas**

As troponinas são proteínas estruturais constituintes do sistema contrátil do tecido muscular cardíaco e esquelético, onde são responsáveis pela regulação da interacção da actina e miosina no controlo da contracção da célula muscular (Panteghini et al, 2008). Uma vez que as troponinas são proteínas intracelulares, a sua presença em circulação reflete a libertação de conteúdo dos cardiomiócitos. Assim, as concentrações circulantes de troponinas providenciam informação acerca de lesões especificamente cardíacas, sendo portanto biomarcadores que avaliam a integridade miocárdica (Langhorn & Willesen, 2016).

Um estudo verificou que os níveis de troponina cardíaca I se encontravam significativamente mais elevados em animais com DCC relativamente a indivíduos seronegativos. Os níveis elevados deste biomarcador parecem correlacionar-se ainda com Índices Cardiovertebrais (ICV) superiores ao limite de referência e alterações no Electrocardiograma (ECG) (Carréton et al., 2011). Mesmo pequenos aumentos são indicativos de lesão miocárdica, pelo que estes biomarcadores são de elevado valor diagnóstico na detecção precoce de lesão do tecido cardíaco (Wells & Sleeper, 2008; Langhorn & Willesen, 2016).

#### **8.4.2. Mioglobina**

Alguns estudos apontam para a existência de elevados valores de mioglobina em circulação em 20,8 a 26,6% dos cães infectados com DCC, parecendo existir uma correlação positiva entre indivíduos microfilarémicos e concentrações elevadas de mioglobina em circulação. No entanto, por ser uma proteína inespecífica, presente tanto no músculo cardíaco como no esquelético, não foi ainda possível determinar a sua origem nem o papel desempenhado pelas microfilárias nestes aumentos (Carréton et al., 2011, 2012; 2014a).

#### **8.4.3. Proteínas de fase aguda**

Venco et al. (2014) e Carréton et al. (2017a) verificaram que aumentos nas proteínas de fase aguda positivas estão correlacionados com a presença de HP em cães infectados com DCC. Estes estudos sugerem que a Proteína C-Reativa e a Haptoglobina têm um potencial valor prognóstico, podendo vir a funcionar como biomarcadores precoces de HP, ajudar no estadiamento da doença, monitorização da evolução do paciente e avaliação da persistência de lesão arterial após a eliminação dos parasitas.

#### **8.4.4. Endotelina-1**

A Endotelina-1 (ET-1) é um péptido bioactivo produzido por numerosas células, incluindo células endoteliais vasculares, células do músculo liso vascular, células epiteliais das vias aéreas, macrófagos, fibrócitos, miócitos cardíacos, entre outros. É um vasoconstritor potente e promotor da proliferação celular, provocando mudanças estruturais crónicas nos tecidos cardiopulmonares, conduzindo à remodelação tissular (Carréton et al., 2017b).

Um estudo reportou que os níveis plasmáticos da ET-1 em cães com dirofilariose se encontravam elevados, sugerindo que este péptido poderá constituir um fator agravante no quadro clínico enquanto indutor de HP (Uchide & Saida, 2005). No entanto, embora a ET-1 seja um promissor indicador de HP, existem outras doenças que levam ao seu aumento, diminuindo a sua especificidade enquanto biomarcador. É necessária maior investigação para determinar o seu papel no quadro clínico da DCC (Carréton et al., 2017b).

#### **8.4.5. Péptidos natriuréticos**

O péptido natriurético do tipo B (BNP) é produzido pelos miócitos ventriculares e libertado na circulação como pró-hormona em resposta a vários estímulos como sobrecarga de volume, hipertrofia cardíaca e hipóxia. Durante a sua libertação, é lisado enzimaticamente em dois fragmentos: a sua forma biologicamente activa, BNP que conduz à natriurese e vasodilatação, e o fragmento inactivo NT-proBNP. O primeiro tem uma semi-vida de 90 segundos e o segundo cerca de 120 minutos (Thomas & Woods, 2003; Vanderheyden et al., 2004).

Com o conhecimento da autora, até à data foi realizado apenas um estudo relacionando o NT – proBNP com a dirofilariose canina. Nesse estudo 20 cães foram divididos em 4 grupos, baseando-se na gravidade da doença. Os cães das classes I e II apresentaram valores normais de NT-proBNP, enquanto os da classe III apresentaram valores patológicos e na classe IV os valores estavam acima dos limites de detecção do equipamento utilizado para o efeito (Carréton et al., 2014a).

#### **8.4.6. D-dímero**

O d-dímero é um produto final da degradação da fibrina, pelo que concentrações plasmáticas elevadas deste biomarcador indicam a presença de trombos em circulação e a sua degradação (Nelson & Andreasen, 2003). Surge 1 hora após um episódio tromboembólico e mantém-se elevado durante 7 dias. Estudos mostram que entre 34,8% a 47% dos cães que apresentam um teste antígeno positivo para *D. immitis* possuem níveis de d-dímero acima do nível de referência (Carretón et al., 2011; 2012).

Para confirmar a origem do biomarcador, Carréton et al., (2013a) avaliaram a sua presença no tecido pulmonar e renal de cães infetados através da técnica de imunohistoquímica. A coloração positiva para o d-dímero foi associada à presença de TP, encontrando-se frequentemente fragmentos parasitários rodeados por coágulos. Quando o tecido renal destes cães foi avaliado, todos os indivíduos microfilarémicos apresentaram valores detectáveis de d-dímero dentro dos capilares glomerulares, ao contrário dos amicrofilarémicos onde não se detectou o biomarcador. Este estudo veio fortalecer a hipótese de que a presença de microfilárias em circulação compromete a função renal.

A microfilarémia e a elevada carga parasitária parecem correlacionar-se com elevados valores de d-dímero, evidenciando o papel das microfilárias em circulação no desenvolvimento de tromboembolismos (Carréton et al., 2011; 2013b). Carréton et al., (2013b) verificaram que todos os cães com uma carga parasitária elevada apresentavam níveis de d-dímero elevados em várias ocasiões ao longo do tratamento, devendo-se provavelmente à embolização de fragmentos parasitários. Por outro lado, os cães com baixa carga parasitária apresentaram valores de d-dímero elevados com muito menor frequência e todos tinham níveis indetectáveis a partir da terceira semana após a primeira injeção de melarsomina. Um mês após a última injeção de melarsomina, 33,3% dos cães com cargas parasitárias elevadas apresentavam concentrações de d-dímero elevadas, indicando que os processos tromboembólicos ainda estavam a decorrer. Assim, a restrição de exercício para estes animais deveria ser mais prolongada que a recomendada, sendo o doseamento deste biomarcador uma ferramenta útil na determinação do período a partir do qual é seguro o animal regressar ao seu nível de actividade normal após o tratamento.

O diagnóstico do TP é difícil e passa frequentemente despercebido, uma vez que os sinais clínicos são altamente variáveis, inconsistentes e inespecíficos. Para além disso, muitos animais com TP apresentam radiografias torácicas normais (Goggs et al., 2009) e há falta de testes não invasivos de especificidade e sensibilidade aceitáveis (Nelson & Andreasen, 2003).

Valores de d-dímero elevados ocorrem quando existe a clivagem de qualquer coágulo, podendo surgir em doenças como sépsis, insuficiência cardíaca, insuficiência hepática ou neoplasia (Carréton et al., 2017b). Não obstante, é o biomarcador de eleição para o diagnóstico de CID e TP, sendo de grande valor na exclusão destes diagnósticos diferenciais quando não é detectado em circulação, tornando-os altamente improváveis (Nelson & Andreasen, 2003; Nelson, 2005b).

#### **8.4.7. Aplicação dos biomarcadores no estadiamento da DCC**

Carréton et al., (2017b) avaliaram a utilidade dos biomarcadores no estadiamento da doença, baseando-se na classificação de Di Sacco e Vezzoni, (1992). Verificou-se que os valores de troponina I e mioglobina aumentavam progressivamente com o agravamento do

quadro clínico, sendo que os animais nos estádios I e II parecem não sofrer uma lesão miocárdica significativa. Relativamente às concentrações séricas de d-dímero, os resultados foram semelhantes, encontrando-se dentro dos valores de referência nas classes I e II e com níveis patológicos em 40% dos cães da classe III e 100% da classe IV. Os animais pertencentes à classe IV apresentavam os valores médios de d-dímero mais elevados. Estes resultados sugerem a ocorrência de tromboembolismos e/ou CID nos animais das classes III e IV e ausência daqueles fenómenos nos primeiros dois estádios da doença.

## **8.5. Radiografia**

As alterações radiográficas estão presentes em aproximadamente 85% dos casos de infecção por DCC. No entanto, numa infecção recente, é frequente não se encontrarem quaisquer lesões, ou apenas um ligeiro padrão alveolar ou intersticial. As radiografias torácicas podem mostrar, num estágio clínico avançado, dilatação e tortuosidade das artérias pulmonares, padrões pulmonares anormais e cardiomegália direita. Se existir insuficiência cardíaca congestiva direita, podem ainda ser observadas efusões peritoneais e pleurais, dilatação da veia cava caudal, espleno e hepatomegália e ascite (Venco, 2007).

É importante realizar duas projecções radiográficas – ventrodorsal (VD) ou dorsoventral (DV) e latero-lateral (LL) –, uma vez que cada uma providencia informações diferentes relativamente às lesões provocadas pela DCC.

Na projecção LL são mais facilmente observáveis alterações como a dilatação da artéria pulmonar cranial direita (que não deve ter um diâmetro superior ao da veia pulmonar cranial direita ou ao terço proximal da quarta costela) e tronco pulmonar, cardiomegália direita caracterizada por aumento do contacto esternal e elevação do ápex cardíaco, edema perihilar, deslocamento dorsal da traqueia e padrões pulmonares anormais tipicamente observados nos lobos pulmonares caudais (Figura 6). Os padrões pulmonares são frequentemente mistos (alveolar-intersticial) e estão associados à ocorrência de pneumonia alérgica eosinofílica. O aparecimento de nódulos intersticiais associados a linfadenopatia brônquica atribui-se à granulomatose eosinofílica, e a coalescência de infiltrados alveolares e intersticiais e está associada a fenómenos de TP (Bowman & Atkins, 2009).

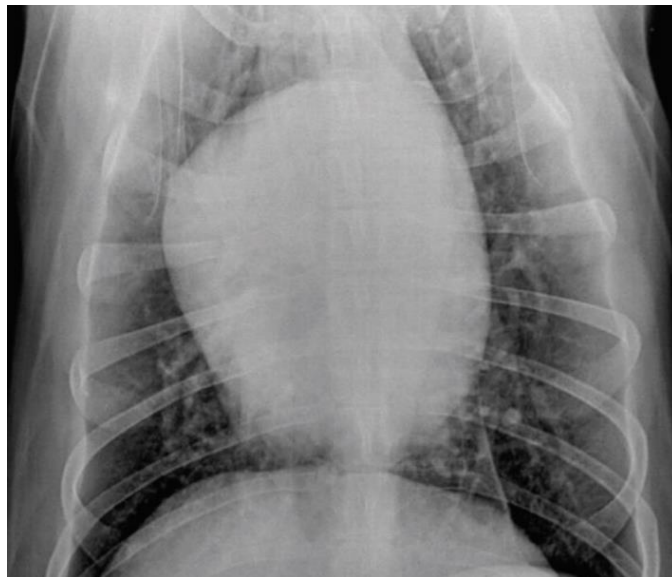
A projecção VD é preferida para a avaliação da silhueta cardíaca e artéria pulmonar principal. Por vezes a silhueta cardíaca surge com a forma de “D invertido” devido ao aumento do ventrículo direito. Já a projecção DV é superior na avaliação dos vasos pulmonares do lobo caudal, que se consideram dilatados quando o seu diâmetro ultrapassa o da nona costela, à altura da intersecção artéria-costela (Bowman & Atkins, 2009).

Losonsky et al. (1983) encontrou alterações radiográficas consistentes com DCC em 172 dos 200 cães que constituíam a sua amostra. As alterações mais frequentes foram a dilatação do ventrículo direito, artéria pulmonar principal e artéria cranial do lobo pulmonar

direito. O mesmo estudo concluiu ainda que animais com dilatação marcada de uma das variáveis mencionadas, apresentavam elevada probabilidade de verificar o mesmo nas outras.

As radiografias são úteis na avaliação da gravidade de lesões pulmonares mas não para estimar a carga parasitária. Cães com baixos níveis de actividade física podem apresentar uma grande carga parasitária e ser clinicamente assintomáticos sem lesões radiográficas visíveis. Por outro lado, ao longo do período de infecção pode verificar-se a redução da população de nemátodes devido a fenómenos de morte espontânea, que, ao provocar tromboembolismos pulmonares, pioram a imagem radiográfica (Venco et al., 2003).

**Figura 6** - Radiografia torácica de cão infectado com dirofilariose cardiopulmonar (AHS, 2018).



Legenda: Projeção dorso-ventral onde se observa o aumento das câmaras cardíacas direitas com a silhueta cardíaca na forma de “D” invertido.

## 8.6. Ecocardiografia

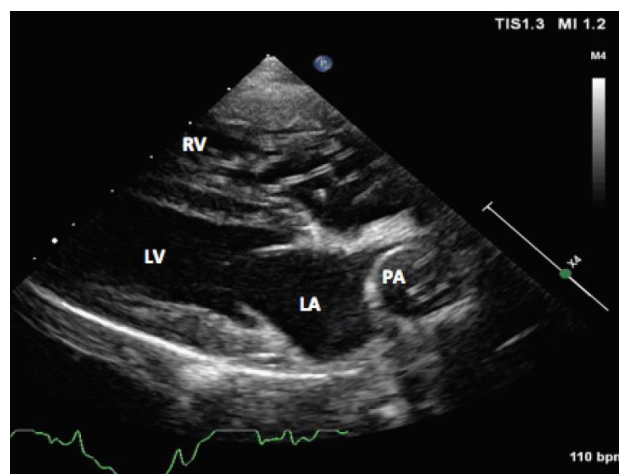
A ecocardiografia permite a visualização dos nemátodes adultos nas câmaras cardíacas direitas, veia cava caudal, artéria pulmonar principal e segmento proximal das artérias pulmonares caudais. As dirofilárias surgem na imagem ecográfica como duas linhas paralelas hiperecogénicas. Este exame contribui para aumentar a precisão do estadiamento da doença e estimar a carga parasitária, permitindo adaptar o protocolo de tratamento (Venco, 2007).

Um estudo de Venco et al. (2003) comparou achados ecocardiográficos com os níveis de antígenos circulantes para estimar a carga parasitária. Verificou que quando os nemátodes adultos eram visualizados no tronco pulmonar e/ou nas artérias pulmonares intralobares proximais, era mais provável a carga parasitária ser clinicamente significativa. Quando apenas se observavam algumas dirofilárias na artéria pulmonar direita, estendendo-se até à artéria pulmonar principal, a carga parasitária era considerada como sendo baixa.

Os achados ecocardiográficos em cães com dirofilariose em estado avançado incluem dilatação do átrio e ventrículo direito, hipertrofia do ventrículo direito, movimento paradoxal do septo interventricular, diminuição das câmaras cardíacas esquerdas e dilatação da artéria pulmonar. A medição da velocidade máxima de fluxo regurgitante da válvula tricúspide ou pulmonar com recurso a doppler espectral permite estimar o grau de HP (Ware, 2014). Verificou-se ainda que o rácio da dimensão interna de ambos os ventrículos se encontra frequentemente reduzido de um valor normal de 4 para um valor médio de 0,7 (Bowman & Atkins, 2009).

Finalmente, este exame é muito útil na confirmação rápida de suspeitas de SVC e deteta a presença de sinais que acompanham a ICD como a ascite e efusão pericárdica ou pleural (Ware, 2014).

**Figura 7** – Ecocardiografia de cão infectado com dirofilariose cardiopulmonar (AHS, 2018).



Legenda: Vista direita do eixo paraesternal longo de cão com 8 anos de idade que se apresentou à consulta letárgico. É visível uma massa de nemátodes adultos a atravessar a válvula tricúspide, a hipertrofia do ventrículo direito e dilatação do átrio direito. A artéria pulmonar está gravemente dilatada e contém parasitas no seu interior. RV – ventrículo direito, PA – artéria pulmonar, LA – átrio esquerdo, LV – ventrículo esquerdo.

### 8.7. Electrocardiograma

Por norma o ECG de um cão infectado com dirofilariose cardiopulmonar está normal. Quando existe HP crónica são visíveis padrões de hipertrofia ventricular direita, associados

a ICD grave. Arritmias estão geralmente ausentes ou são ligeiras (2-4% dos casos), excepto em casos de SVC e insuficiência cardíaca avançada. Como complicação ocasional de HP grave surge a fibrilhação atrial (Calvert & Thomasson, 2007; Bowman & Atkins, 2009).

Lombard & Ackerman (1984) verificaram a presença de alterações no ECG de 38% a 62% dos cães infectados com DCC com alterações graves na ecocardiografia, enquanto Calvert & Rawlings (1986) observaram que apenas 6% de uma amostra de 276 cães com dirofilariose apresentavam alterações no ECG compatíveis com dilatação ventricular direita. Calvert & Rawlings (1988) sugeriram ainda que os parâmetros mais sensíveis para a detecção de DCC são ondas S com amplitudes superiores a 0,8 mV na derivação II, um eixo eléctrico médio superior a 103º e a existência de mais de 3 alterações sugestivas de dilatação cardíaca direita. O achado *P-pulmonale* é considerado pouco comum na DCC (Atkins, 2017).

## **9. Estadiamento**

É importante realizar o estadiamento de cada paciente antes de iniciar o tratamento, principalmente a fase de administração do adulticida. As radiografias torácicas constituem a mais importante ferramenta de avaliação do estágio de doença arterial e parenquimatosa pulmonar. Os critérios a considerar para o estadiamento da DCC variam ligeiramente consoante a bibliografia consultada. No entanto, é de consenso geral a existência de 4 graus de gravidade da doença. A Tabela 1 não contempla todas as alterações possíveis de se encontrar num animal com DCC, mas sim as mais frequentes. Algumas características podem não ser exclusivas de um estágio, não sendo necessário o animal apresentar todos os itens descritos em determinada categoria para ser incluído na mesma. Deste modo, a tabela deve ser interpretada apenas como uma linha de orientação para a classificação da gravidade da doença. O estágio 3 requer uma estabilização rigorosa do paciente antes da terapêutica adulticida e no estágio 4 esta encontra-se contra-indicada devido ao elevado risco de morte (Alonso & Gómez, 2012; Nelson, 2015).



**Tabela 1** - Estadiamento da dirofilariose cardiopulmonar canina (Adaptado de Di Sacco & Vezzoni, 1992; Alonso & Gómez, 2012; Nelson, 2015).

Estádio	Sinais clínicos	Radiografia torácica	Ecocardiografia	Parâmetros laboratoriais	Prognóstico
<b>1 (Ligeiro)</b>	Nenhuns, ou sinais ligeiros	Normal	Normal	Normais	Favorável
<b>2 (Moderado)</b>	Tosse, IE <sup>1</sup> , febre; desdobramento do segundo som cardíaco <sup>2</sup>	Dilatação do ventrículo direito e/ou artérias pulmonares; padrão pulmonar misto <sup>3</sup>	Visualização de filárias adultas em número reduzido	Anemia ligeira, proteinúria ligeira	Reservado
<b>3 (Grave)</b>	Caquexia, inapetência, letargia, tosse persistente, hemoptise, dispneia, ascite, TRC prolongado, mucosas pálidas ou ictéricas, sopro sistólico	Dilatação cardíaca direita, dilatação e tortuosidade de artérias pulmonares, efusão pleural, padrões pulmonares compatíveis com TP <sup>4</sup>	Visualização de filárias adultas nas artérias pulmonares e ventrículo direito	Anemia moderada a grave, proteinúria grave, azotemia e elevação das enzimas hepáticas	Grave
<b>4 (Síndrome da Veia Cava)</b>	Todos os sinais do estágio 3, taquicardia, taquipneia, fraqueza/colapso	Alterações semelhantes às do estágio 3, dilatação da veia cava caudal	Filárias adultas nas artérias pulmonares, ventrículo direito, veia cava caudal e cranial	Alterações observadas no estágio 3, hemólise, hiperbilirrubinemia, hemoglobinúria	Desfavorável

Notas: 1. Intolerância ao exercício. 2. Devido ao atraso no encerramento da válvula pulmonar. 3. Tipicamente alveolar/intersticial. 4. Tromboembolismo Pulmonar.

## 10. Tratamento

### 10.1. Protocolo recomendado pela AHS (2018)

A American Heartworm Society (AHS) recomenda uma abordagem faseada e multimodal para a eliminação de *D. immitis*. O pré-tratamento com doxiciclina e doses profiláticas de lactonas macrocíclicas diminui a patologia pulmonar associada à morte dos nemátodes adultos aquando da administração de adulticida. Esta parece ser a forma mais segura de

realizar o tratamento, minimizando o risco de ocorrência de complicações (McCall et al., 2014).

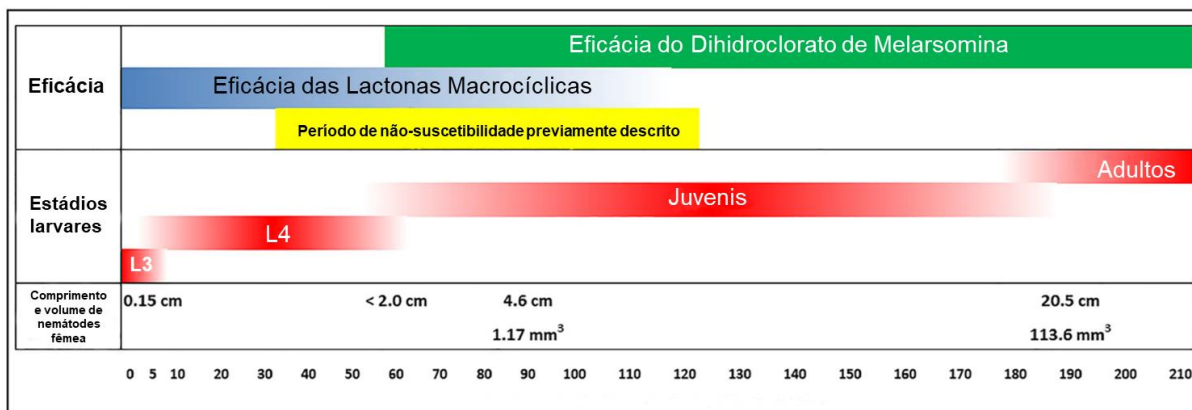
O tratamento com doxiciclina na dose 10 mg/Kg BID deve ser iniciado no dia 0 (dia do diagnóstico - D0) e prolonga-se até ao D28. No D0 deve ser iniciada idealmente a restrição de exercício físico, tanto maior quanto mais grave o quadro clínico do animal. Se o animal for sintomático está recomendado o início de prednisolona na dose 0,5mg/kg BID na primeira semana, 0,5 mg/kg SID na segunda semana e 0,5 mg/kg EOD na terceira e quarta semana (AHS, 2018).

No D1 recomenda-se a administração da terapêutica preventiva com recurso a uma Lactona Macrofílica (LM), com o cuidado de instituir um pré-tratamento com antihistamínico e glucocorticóide se forem detectadas microfilárias circulantes, caso não tenha sido iniciado o protocolo com prednisolona (AHS, 2018).

Ao D30 ocorre a segunda administração de lactona macrofílica, e ao D60 a terceira LM bem como a primeira aplicação de hidroclorato de melarsomina na dose de 2,5 mg/kg (IM) (AHS, 2018). A AHS defende que a vantagem de o tratamento adulticida ocorrer somente após duas tomas de LM é possibilitar a diminuição da população de microfilárias e a maturação de larvas não susceptíveis a nenhum dos fármacos, em adultos, ultrapassando o período de não-susceptibilidade ao tratamento. A ocorrência deste período está descrita entre os 30 dpi e os 80-120 dpi, com uma duração aproximada de 3 meses (Figura 7).

No entanto, dados recentes sugerem que o dihidroclorato de melarsomina tem uma maior eficácia contra estádios de desenvolvimento juvenis do que se pensava, contrariando a existência de um período de susceptibilidade (Figura 7). Seguindo esta evidência, o tratamento simultâneo com microfilaricida e adulticida na altura do diagnóstico optimizaria a eliminação máxima e rápida da dirofilariose. Assim, alguns autores defendem que adiar a terapêutica adulticida 2 a 3 meses após o diagnóstico pode ser prejudicial ao permitir o amadurecimento parasitário e consequente agravamento de lesão vascular pulmonar associada à morte de um maior número de filárias (Bowman & Drake, 2017).

**Figura 8** – Eficácia comprovada das lactonas macrocíclicas e dihidroclorato de melarsomina sobre os estádios de desenvolvimento larvar da *D.immitis* (Adaptado de Bowman & Drake, 2017).



Na altura da aplicação da melarsomina inicia-se um ciclo de prednisolona semelhante ao descrito acima. Nesta fase é imperativo restringir o espaço do animal para que ele permaneça em máximo repouso possível até ao final do tratamento (AHS, 2018).

Ao D90 repetem-se as administrações de microfilaricida e adulticida e 24 horas depois aplica-se a terceira e última injeção de melarsomina, prescrevendo novo ciclo de prednisolona idêntico aos anteriores. A restrição de exercício deve continuar por mais 6 – 8 semanas (AHS, 2018).

No D120 efectua-se uma pesquisa de microfílias circulantes e se positivo, continua-se o tratamento com microfilaricida e repete-se o teste 4 semanas depois. Se negativo, estabelece-se a prevenção anual contra a dirofilariose (AHS, 2018).

Ao D365 efetua-se o teste de antígeno circulante e teste para microfílias para confirmar a eliminação da infecção. Em caso de resultado positivo repete-se novo ciclo de 4 semanas de doxiciclina seguido de duas doses de melarsomina com 24 horas de diferença (AHS, 2018).

## 10.2. Doxiciclina

À medida que a associação entre *Wolbachia* e *D. immitis* é melhor compreendida, mais se evidencia a importância da eliminação da bactéria no decorrer do tratamento da dirofilariose (Martin & Gavotte, 2010).

A doxiciclina foi desde o início considerada o antibiótico de primeira escolha para a eliminação da bactéria *Wolbachia*. O protocolo de administração de doxiciclina em cães é baseado no trabalho pioneiro de McCall e colegas, que verificaram a redução ou eliminação completa dos microrganismos *Wolbachia* em todos os estádios de desenvolvimento dos

nemátodes durante um período de até 12 meses, na dose de 10 mg/Kg BID durante 4 semanas (McCall et al., 2014).

No tratamento de filariose humanas, diversos estudos verificaram que a doxiciclina apresenta propriedades adulticidas com taxas de eficácia na ordem dos 70% (Tamarozzi et al., 2012). No entanto, os efeitos adulticidas em infecções provocadas por *D. immitis* em cães foram estudados por Bazzocchi et al. (2008), não tendo sido encontrados resultados significativos. Curiosamente, o mesmo estudo verificou que a administração conjunta de doxiciclina e ivermectina resulta numa actividade adulticida mais rápida do que a terapêutica com apenas ivermectina, e numa redução mais eficaz da população de *Wolbachia* do que a administração de apenas doxiciclina.

Diversos estudos experimentais comprovaram a diminuição de lesões no parênquima pulmonar de animais tratados com doxiciclina e ivermectina antes da administração de melarsomina (Dzimianski et al., 2006; McCall et al., 2008a, Kramer et al., 2008). Assim, a doxiciclina deve ser sempre administrada antes da melarsomina para que *Wolbachia* e suas moléculas associadas se encontrem reduzidas ou ausentes aquando da morte e fragmentação dos nemátodes (Nelson et al., 2017).

Recentemente a minociclina começou a ser investigada como possível alternativa à doxiciclina, com diversos estudos a indicar que a primeira apresenta uma maior actividade *in vitro* e maior eficácia *in vivo* na eliminação do microrganismo *Wolbachia*, relativamente à segunda. Embora ainda não existam estudos a avaliar a eficácia da minociclina no tratamento da DCC, a dose de 5 mg/Kg PO BID está descrita para futuros ensaios clínicos (Papich, 2017).

### **10.3. Terapêutica microfilaricida**

Os fármacos microfilaricidas actualmente comercializados pertencem à classe das LM onde se incluem as avermectinas (ivermectina e selamectina) e milbemicinas (milbemicina oxima e moxidectina). São eficazes contra microfilárias, L3 e L4, e em alguns casos de uso contínuo, parasitas adultos (McCall et al., 2001b). A maioria dos cães torna-se amicrofilarémico 6 a 8 meses após o início do tratamento com estes fármacos (Ware, 2014).

#### **10.3.1. Lactonas macrocíclicas**

Recomenda-se a administração mensal de ivermectina devido ao seu espectro de actividade mais alargado face aos diferentes estádios larvares. Os fármacos à base de milbemicina também são eficazes, no entanto têm o inconveniente de eliminar as microfilárias de forma muito mais rápida, aumentando o risco de ocorrência de um choque anafilático e pneumonia alérgica em cães com uma grande concentração de microfilárias em circulação. Os efeitos sistémicos secundários à administração de milbemicina podem surgir 3 a 12

horas após a toma e incluem letargia, inapetência, sialorreia, defecação, palidez e taquicardia. Os produtos à base de selamectina e moxidectina eliminam as microfilárias a baixa velocidade, sendo considerados por alguns autores inadequados ao tratamento de uma infecção activa. Outros fármacos utilizados como microfilaricidas no passado (levamisol, ditiазanina, fention) estão desaconselhados devido à sua baixa eficácia e efeitos adversos frequentes (Alonso & Gómez, 2012, Ware, 2014).

Quando administradas em doses microfilaricidas (Tabela 2), a ivermectina e a milbemicina oxima reduzem rapidamente a população de microfilárias. No entanto, os riscos da ocorrência de efeitos adversos derivados da morte repentina dos parasitas excedem os benefícios do aumento da rapidez do processo terapêutico. Assim, ao longo de todo o tratamento está recomendada a administração de uma lactona macrocíclica em doses preventivas (Alonso & Gómez, 2012, Ware, 2014).

**Tabela 2** – Dose preventiva, terapêutica e tóxica de duas lactonas macrocíclicas utilizadas no tratamento da DCC (adaptado de Alonso & Gómez, 2012).

Princípio ativo	Dose preventiva	Dose microfilaricida	Dose tóxica
Ivermectina	6 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg
Milbemicina	500 µg/kg	500 µg/kg	5000 µg/kg

Alguns cães da raça Collie e outras raças deficientes em Glicoproteínas-P são sensíveis a uma variedade de medicamentos frequentemente utilizados na prática clínica, onde se incluem as LM. No entanto, a sua toxicidade foi relatada em doses 16 vezes superiores à dose mínima profiláctica indicada na tabela 2, pelo que as doses preventivas padrão são seguras para todas as raças (Alonso & Gómez, 2012). Após a administração de cada LM recomenda-se a observação do animal durante 8 a 12 horas (Ware, 2014).

#### 10.4. Terapêutica adulticida

Durante décadas a Tiacetarsamida foi a única molécula aprovada para o tratamento adulticida da dirofilariose canina, tendo sido depois substituída por um organoarsénico mais seguro e eficaz denominado Melarsomina (Atkins, 2017).

#### 10.4.1. Dihidroclorato de Melarsomina

O Dihidroclorato de Melarsomina (Immiticide®) é eficaz contra as formas maduras e imaturas do parasita, sendo que os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas (Ware, 2014).

O protocolo actualmente recomendado pela AHS contempla a administração de 3 doses de adulticida, resultando na morte de apenas metade dos nemátodes após a primeira injeção e diminuindo assim o risco de desenvolvimento de complicações associadas a TP. Após as 2 últimas administrações 98% da população de *D.immitis* é eliminada. Este protocolo implica maiores custos devido a um maior número de administrações, uma maior exposição ao composto arseniacal e requer um período de restrição de exercício físico mais prolongado. O protocolo de apenas 2 administrações separadas por um período de 24 horas continua a ser uma opção viável em casos de quadros clínicos ligeiros, quando existem restrições financeiras e/ou quando estão presentes hepatopatias ou nefropatias graves, uma vez que a potencial toxicidade arseniacal é superior nestes pacientes. Com este protocolo a taxa de morte de nemátodes adultos é de 90%, no entanto é possível obter melhorias clínicas significativas sem a morte da totalidade da população (Ware, 2014).

A melarsomina é rapidamente absorvida a partir do local de injeção. O fármaco inalterado e um metabolito principal são eliminados rapidamente nas fezes, enquanto um metabolito secundário é excretado na urina. O fármaco deve ser administrado através de injeção IM profunda nos músculos lombares entre as vértebras L3 e L5. O lado em que é administrado o fármaco é registado na primeira vez, de modo a utilizar-se o lado oposto aquando da próxima injeção e assim sucessivamente ao longo do tratamento. Os músculos lombares constituem um local de boa vascularização e drenagem linfática com pouco planos fasciais. Para além do mais, a gravidade pode ajudar a prevenir a migração do fármaco para tecidos subcutâneos, onde pode provocar mais irritação. Existe uma reacção no local da injeção notória em cerca de um terço dos cães, que desaparece em 4 a 12 semanas. O fabricante refere a possibilidade de persistência de nódulos firmes por tempo indefinido. A administração de um anti-inflamatório não esteróide (AINE) imediatamente ou uns dias antes do adulticida pode ajudar a reduzir o desconforto provocado pela reacção (Ware, 2014; Atkins., 2017).

A melarsomina está disponível sob a forma de pó liofilizado em frascos de 50 mg. O produto re-hidratado mantém-se estável durante 24 horas se mantido refrigerado e ao abrigo da luz. A maior parte dos sinais clínicos apresentados após a administração do fármaco são vocalização, tremores, letargia, agitação, inquietação, ataxia, arfar, respiração superficial ou forçada e fúres. Pode ainda observar-se edema e vermelhidão no local da injeção e aumento da actividade das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e Creatina-cinase. Cerca de 15% dos animais apresenta letargia, depressão e anorexia e outros efeitos adversos como febre, vómitos e diarreia ocorrem ocasionalmente. Todos os efeitos

adversos são geralmente ligeiros nas doses recomendadas. No entanto a sua margem de segurança é baixa: a sobredosagem pode provocar colapso, salivação grave, vômitos, stress respiratório resultante de inflamação pulmonar e edema, estupor e morte (Ware, 2014).

Alterações hepáticas e renais não são clinicamente relevantes em animais que recebem a dose recomendada de melarsomina. Se ocorrer uma reacção sistémica grave após a primeira injeção, a segunda fase do tratamento adulticida é adiada ou eventualmente cancelada (Atkins, 2017).

### **10.5. Patologia associada à morte das filárias**

A terapêutica adulticida farmacológica bem-sucedida pressupõe o desenvolvimento de eventos tromboembólicos e reacções pró-inflamatórias intensas nos pulmões (Atkins, 2017). Vários estudos indicaram que após a administração de melarsomina um número significativo de cães apresentou agravamento das radiografias torácicas e um aumento da pressão pulmonar (Vezzoni et al., 1992; Miller et al., 1995). Embora a recuperação ocorra geralmente sem complicações, os cães mais gravemente afectados estão em risco e a mortalidade pode chegar aos 8% (Mavropoulou et al., 2014).

A doença arterial pulmonar piora nos 5 a 30 dias após a terapêutica adulticida e pode ser especialmente grave em cães previamente sintomáticos. Os nemátodes mortos promovem a trombose e obstrução das artérias pulmonares, com exacerbação da adesão plaquetária, proliferação mioíntima, hipertrofia vilosa, arterite granulomatosa, edema perivascular e hemorragia. A tromboembolização pulmonar tem maior probabilidade de ocorrer nos 7 a 17 dias pós-adulticida. A obstrução do fluxo sanguíneo pulmonar e o aumento da resistência vascular esgotam o VD e aumentam a exigência de oxigenação, de onde pode resultar uma diminuição do débito cardíaco e hipotensão. Depressão, febre, taquipneia ou dispneia e tosse são sinais clínicos observados frequentemente. Hemoptise, ICD e colapso ou morte são uma possibilidade. A inflamação pulmonar alveolar e intersticial e a acumulação de fluidos provocam fervores audíveis à auscultação. A consolidação pulmonar focal pode provocar áreas de sons pulmonares abafados. Radiografias torácicas mostram infiltrados alveolares rendilhados com broncogramas de ar, especialmente junto às artérias lobares caudais. Nestes casos pode ser visível uma neutrofilia com desvio à esquerda ou trombocitopenia. O tratamento do TP inclui repouso absoluto e terapia com glucocorticóides para reduzir a inflamação pulmonar. A suplementação com oxigenoterapia é recomendada para reduzir a vasoconstrição pulmonar mediada pela hipóxia. Um broncodilatador como a aminofilina ou teofilina na dose de 9 mg/kg PO q6-8h, fluidoterapia em caso de choque cardiovascular e supressores da tosse podem ser úteis no manejo desta patologia. As alterações endoteliais regredem 4 a 6 semanas após o adulticida. Eventualmente a pressão

arterial pulmonar e o perfil das artérias pulmonares proximais normaliza, embora possa persistir alguma fibrose (Ware, 2014)

## **10.6. Terapêutica de suporte**

### **10.6.1. Corticosteróides**

Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores inerentes aos corticosteróides são úteis no tratamento médico da DCC, sendo a prednisolona o esteróide mais recomendado. Corticosteróides com ou sem anti-histamínicos podem ser administrados profilacticamente em pacientes altamente microfilarémicos, estando sugeridos protocolos como dexametasona na dose de 0,25 mg/kg EV e difenidramina a 2 mg/kg IM; ou prednisolona a 1 mg/kg PO, 1 hora antes e  $\pm$  6 horas depois da primeira dose de LM preventiva. Esta terapêutica é muito útil no tratamento de reacções imunomediadas às dirofilárias no parênquima pulmonar, como granulomas eosinofílicos, fenómenos de TP e pneumonia eosinofílica. Para a pneumonia está indicada a administração de prednisolona na dose de 1 mg/kg/dia PO durante 3 a 5 dias e 1 – 2 mg/kg/dia PO para o manejo de TP, até se verificarem melhorias clínicas e radiográficas (Atkins, 2017).

Para o manejo de reacções adversas ao microfilaricida está recomendada a administração de prednisolona na dose de 10mg/kg EV ou dexametasona a 2-4 mg/kg EV e fluidoterapia (80 mL/kg durante 2 horas), com boas taxas de resposta se instituídas de imediato (Ware, 2014).

A administração sistemática de corticosteróides a todos os animais em tratamento ou apenas nos casos mais graves é controversa. A corticoterapia pode piorar a patologia vascular ao nível da túnica íntima, actuar como pró-coagulante e diminuir o fluxo sanguíneo pulmonar quando continuada por várias semanas, exacerbando fenómenos de TP (Stuijver et al., 2013; Atkins, 2017). Carréton et al. (2014b) reportaram ainda que cães que receberam prednisolona apresentaram concentrações médias de d-dímero elevadas durante o tratamento adulticida.

### **10.6.2. Agentes antitrombóticos**

Os agentes antitrombóticos como o ácido acetilsalicílico têm o potencial de diminuir a lesão vascular provocada por fragmentos de larvas mortas, reduzir fenómenos tromboembólicos, entre outros, no entanto os estudos recentes apresentam resultados controversos sem evidência clínica suficiente para apoiar a sua utilização. Por estas razões, a AHS não apoia a terapêutica antitrombótica no tratamento de rotina da DCC. Se utilizado, o ácido acetilsalicílico na dose de 5-7 mg/kg/dia é administrado PO, começando 1 a 3 semanas antes do adulticida e continuado por 4 a 6 semanas depois. A terapêutica com este fármaco é evitada ou descontinuada caso se estabeleça um protocolo de corticoterapia, ou ocorra



manifestação de sinais gastrointestinais como melena, emese persistente, trombocitopénia ou hemoptise. Não existem estudos relativamente à utilização do clopidogrel na DCC. A heparina foi estudada unicamente com o adjuvante tiacetarsamida, pelo que a sua utilização também não é advogada no actual protocolo terapêutico (Atkins, 2017).

### **10.6.3. Anti-inflamatórios não esteróides**

Para além do ácido acetilsalicílico referido anteriormente pelo seu papel antitrombótico, a utilização de outros anti-inflamatórios não esteróides (p.ex. carprofeno, firocoxib, meloxicam) poderia adequar-se ao maneio ou prevenção da inflamação muscular associada à injeção de melarsomina. No entanto, estes agentes têm potenciais efeitos secundários adversos sob a forma de hemorragia gastrointestinal e nefrotoxicidade. Devido à possibilidade de existência de um quadro clínico de nefropatia no cão infectado com DCC, bem como de insuficiência cardíaca congestiva, a utilização destes fármacos não é recomendada pela AHS (Atkins, 2013).

### **10.7. Remoção cirúrgica dos parasitas adultos de *D.immitis***

Considerando os riscos associados à morte massiva dos nemátodes adultos após a administração de melarsomina, seria mais seguro para o paciente se se efectuasse a extracção cirúrgica da maior parte destes parasitas (Atkins, 2017).

A remoção cirúrgica dos nemátodes é uma forma de reduzir a carga parasitária na artéria pulmonar principal e ramos lobares (Ware, 2014). Sasaki, Kitagawa, e Ishihara (1988) descreveram um método de remoção mecânica das larvas adultas utilizando um fórceps crocodilo extensível e um fluoroscópio ou ecocardiografia transesofágica para orientação. Reportaram uma eficácia de 90% em 36 cães com quadros clínicos variáveis, sendo que apenas 2 dos 9 cães gravemente afectados morreram de insuficiência cardíaca e renal ao longo de 90 dias do período pós-operatório. Estes dados sugerem que com um cirurgião experiente a técnica é segura. Outros estudos reportam taxas de sobrevivência entre os 50 e 80% (Yoon et al., 2005; Lee et al., 2008a; Bové et al., 2010). Os cães sujeitos a este procedimento cirúrgico continuam a requerer a administração de melarsomina (apenas 2 doses) para garantir a eliminação total dos nemátodes adultos. Devido ao seu elevado custo e riscos inerentes, este procedimento é considerado sobretudo em animais que sofrem da SVC. Inicia-se com o posicionamento do animal em decúbito lateral esquerdo e preparação da região da veia jugular direita. De seguida realiza-se a venotomia da jugular, o seu isolamento e inserção dos instrumentos de recolha, que podem ser vários tipos de fórceps,

cestos de recolha endoscópicos ou escovas para alcançar e retirar os parasitas. O instrumento é passado cuidadosamente até ao AD com o objectivo de recuperar o máximo número de parasitas sem os fragmentar. Outra técnica utilizada em cães de porte pequeno é a canulação auricular direita através de toracotomia para remoção dos nemátodes. A terapêutica adulticida pode ser iniciada algumas semanas após a estabilização do paciente (Ware, 2014; Atkins, 2017).

Alho et al. (2016) desenvolveram um laço não-traumático como método alternativo para a remoção mecânica dos parasitas, adaptando um fio coronário frequentemente utilizado em pacientes humanos. A intervenção foi realizada num cão idoso que se apresentou à consulta com tosse, dispneia, intolerância ao exercício e síncope, ao qual se confirmou o diagnóstico de dirofilariose cardiopulmonar. Foram recolhidos 15 nemátodes adultos do VD e porção proximal da artéria pulmonar. Oito meses após a cirurgia o animal encontrava-se assintomático e activo (Alho et al., 2016). O laço é uma técnica mais segura quando comparada com fórceps ou escovas, uma vez que minimiza a ocorrência de lesão intracardiaca e vascular. É também vantajosa relativamente ao cesto de recolha uma vez que permite ao operador controlar o grau de encerramento do laço, reduzindo o risco de traumatizar ou fragmentar os parasitas enlaçados (Small et al., 2008).

#### **10.8. Protocolos de tratamento alternativos: Lactonas macrocíclicas enquanto adulticidas**

A prática da utilização de LM a longo prazo pelas suas propriedades adulticidas designa-se por morte lenta. A ivermectina é a LM mais estudada e utilizada para este fim. Administrações a longo prazo de doses preventivas de ivermectina provaram ser eficazes na eliminação de infeções naturais e experimentais (Atkins, 2017)

Mavropoulou et al. (2014) verificaram que a combinação de doxiciclina (10 mg/kg/SID durante 30 dias) e ivermectina (6 µg/kg q15 dias durante 6 meses) é bem tolerada no tratamento da DCC. Foram avaliadas as alterações ecocardiográficas e radiográficas ao longo do tratamento combinado e concluíram que as complicações foram mínimas. Ao D300 80% dos cães apresentava um teste antigénio negativo (Mavropoulou et al., 2014)

Num estudo de Dzimianski et al., (2001) a selamectina, quando administrada continuamente durante 18 meses matou aproximadamente 40% das larvas transplantadas.

Uma combinação de imidacloprid com moxidectina administrada mensalmente, associada a um ciclo de doxiciclina foi eficaz na eliminação de infeções de 5 meses experimentais (Chandrashekar et al., 2014). A milbemicina oxima e a moxidectina na sua forma injectável de longa duração parecem ter uma eficácia adulticida mínima (McCall et al., 2001a).

Embora esta estratégia terapêutica possa ser considerada em casos de restrições financeiras ou problemas médicos concomitantes, as LM nunca devem constituir a primeira abordagem adulticida (AHS, 2018).

Esta abordagem é muito apelativa pela possibilidade de evitar a utilização de um composto arseniacal e todas as complicações inerentes à sua administração, e pela redução dos custos do tratamento a curto prazo. A preocupação com o potencial desenvolvimento de resistência às LM também foi diminuída desde que se descobriu que a administração concomitante de doxiciclina reduz a carga parasitária mais rapidamente. Argumentos contra o uso da ivermectina para morte lenta são o facto de a sua utilização ser *off-label*, requerer uma grande aderência e compromisso por parte do tutor tendo em conta que é um protocolo muito prolongado no tempo, haver dificuldade em estabelecer a duração e grau de restrição de exercício físico que seria seguro para o animal devido à ausência de uma morte parasitária controlada, falta de conhecimento relativamente ao efeito da libertação crónica de antigénios nos rins e pulmões e os estudos realizados neste âmbito avaliaram apenas casos de infeções recentes, pelo que não se sabe se a eficácia se mantém para infeções mais antigas (Atkins, 2017).

Ao optar por este protocolo, o animal deve ser tratado ao longo de um período mínimo de 2 anos com ivermectina e sujeito a ciclos de doxiciclina com a duração de 4 semanas, a cada 3-4 meses. O teste de detecção de antigénio deve ser realizado a cada 6 meses e o tratamento termina após dois testes consecutivos negativos (Ware, 2014).

## **11. Prognóstico**

O prognóstico de um animal assintomático é geralmente bom, e apesar de ser reservado para animais no estágio 4, uma grande percentagem destes casos são tratados com sucesso. Os factores que mais afectam o prognóstico são a presença de CID, SVC, embolismos pulmonares massivos, granulomatose eosinofílica, doença arterial pulmonar grave e insuficiência cardíaca (Atkins, 2017).

Após a terapêutica adulticida as lesões produzidas na túnica íntima regridem rapidamente, sendo notadas melhorias 4 semanas após a conclusão do tratamento. As lesões radiográficas começam a desaparecer em 3 a 4 semanas e a HP é reduzida em alguns meses, podendo normalizar 6 meses após a terapêutica adulticida. As alterações do parênquima pulmonar tendem a piorar durante os 6 meses após a terapêutica adulticida, ocorrendo uma resolução marcada nos 2 a 3 meses seguintes. A corticoterapia acelera a resolução destas lesões. A irreversibilidade da doença renal que alguns animais desenvolvem é também pouco frequente e as lesões glomerulares resolvem-se no espaço de meses pós-adulticida. Dependendo da sua gravidade, todas as lesões referidas podem

regredir na totalidade ou não. Os sinais de insuficiência cardíaca são reversíveis com a terapêutica sintomática, restrição de exercício físico e tratamento bem-sucedido (Atkins, 2017).

## **12. Profilaxia**

A profilaxia da DCC pode ser conseguida através da utilização de fármacos com actividade repelente que impedem a picada do mosquito vector e de moléculas que interrompem a infecção por *D. immitis*, eliminando o estágio L3 inoculado pelo mosquito e o estágio L4, que amadurece nos tecidos do cão (Bowman, 2012; ESCCAP, 2012).

Teoricamente a prevenção deve começar dentro de um mês após o início da época de transmissão e terminar um mês após o final do período de actividade do mosquito, no entanto actualmente a recomendação mais segura é a instituição de um programa profiláctico ao longo de todo o ano, considerando as alterações climáticas e consequente perda de épocas bem definidas de actividade do vector (Nelson et al., 2005a).

Os cachorros devem iniciar a profilaxia o mais cedo possível, de preferência antes da oitava semana. Antes de iniciar a prevenção em cães com mais de sete meses de idade, devem ser realizados os testes de antígeno circulante e microfilárias (AHS, 2018).

Os helmintes jovens que podem estar presentes a partir dos 52 dias pós infecção são menos susceptíveis aos fármacos quimioprofiláticos (McCall et al., 2001b). À medida que vão amadurecendo, são necessárias mais doses mensais seguidas para que sejam eliminados. Essa eficácia parcial das doses repetidas em vermes mais maduros é um mecanismo de segurança adicional em caso de esquecimento ou atraso na administração de uma dose, mas não justifica uma recomendação para que as doses sejam espaçadas por mais de 30 dias nas formulações orais e tópicas (AHS, 2018).

A ivermectina, moxidectina, milbemicina e selamectina são as LM disponíveis para a prevenção da DCC. Estas são frequentemente comercializadas em conjunto com outros fármacos de modo a expandir as suas indicações e incluir o controlo e tratamento de parasitas gastrointestinais (Genchi et al., 2007a). Na tabela 3 estão indicadas as apresentações comerciais das LM disponíveis em Portugal e respectivas indicações.

**Tabela 3** - Formas comerciais das lactonas macrocíclicas disponíveis para a prevenção da DCC em Portugal (Adaptado de Atkins, 2017; Apifarma, 2018).

Molécula	Ivermectina/ Pirantel	Milbemicina oxima/ Praziquantel	Moxidectina/ Imidaclopride	Moxidectina	Selamectina
Nome comercial	Heartgard®	Milbemax®	Advocate®	Guardian®	Stronghold®
Via administração	Oral	Oral	Tópica	Subcutânea	Tópica
Frequência administração	Mensal	Mensal	Mensal	Anual	Mensal
<i>D. immitis</i>	+	+	+	+	+
Nemátodes GI	+	+	+		
Céstodes					
Ancilostomatídeos	+	+	+	+	+
Tricurídeos		+	+		
Pulgas			+		+
Carraças					+
Ácaros			+		+

A formulação de libertação lenta sob a forma de moxidectina impregnada com microesferas lipídicas (Guardian ®) fornece uma protecção contínua ao longo de todo o período sazonal de risco da dirofilariose, reduzindo o risco de esquecimentos e falta de *compliance* por parte dos tutores (Apifarma, 2018).

## **IV. Caracterização clínica e epidemiológica da dirofilariose cardiopulmonar canina no concelho de Benavente, Portugal**

### **1. Objectivos**

A clínica VetSam, em Samora Correia, possui uma elevada casuística de DCC, tendência que verifica desde há alguns anos. Assim, tem procurado fornecer aos animais infectados e seus tutores a melhor estratégia terapêutica possível, aconselhando sempre a realização de uma bateria de exames complementares ao longo do tratamento.

Neste sentido, o presente estudo surgiu como uma oportunidade de analisar as fichas clínicas de uma amostra de animais que haviam realizado variados exames complementares no decorrer deste processo.

O principal objectivo foi efectuar a caracterização clínica da DCC numa amostra de cães residentes no concelho de Benavente, identificando as alterações clínicas mais prevalentes e verificar se os achados clínicos iriam ao encontro do que está descrito na bibliografia. Procurou-se ainda determinar se variáveis como a idade avançada, apresentação de microfilarémia, valores de d-dímero elevados ou animais em estádios avançados de doença constituíam factores de mau prognóstico para a população em estudo.

### **2. Material e métodos**

#### **2.1. População em estudo**

Na população em estudo incluem-se os animais diagnosticados com DCC durante o período de estágio (N=24) (Agosto de 2017 a Janeiro de 2018) e uma amostra (N=19) de animais diagnosticados entre Setembro de 2015 a Junho de 2017, na clínica VetSam.

Os últimos foram seleccionados por terem retomado ou continuado o seu tratamento durante o período de estágio e/ou realizado exames complementares relevantes para os objectivos do presente estudo. No Anexo I consta uma tabela com breve informação de cada caso clínico, incluindo a data do diagnóstico.

A caracterização da população foi efectuada com base na idade, sexo e localidade de residência dos indivíduos. Foi ainda realizada a divisão dos animais em grupos correspondentes ao estágio da doença em que se encontravam na altura do diagnóstico, com base na tabela 1 (Alonso & Gómez, 2012; Nelson, 2015).

O diagnóstico foi efectuado através do *kit* comercial ELISA para detecção de antígenos circulantes de *D. immitis* (Urano Vet SL, 2018) e através do exame a fresco de uma gota de sangue para a pesquisa de microfilárias circulantes (Genchi et al., 2007b).

## **2.2. Protocolo de tratamento**

O protocolo de tratamento adoptado pela VetSam segue as recomendações mais recentes da AHS e foi aplicado de forma semelhante a todos os animais incluídos no presente trabalho. Inicia-se no dia do diagnóstico (D0) um ciclo de 4 semanas de Doxiciclina PO, na dose de 10 mg/Kg BID, juntamente com a administração de uma lactona macrocíclica. Caso o animal se encontre num estágio clínico avançado, a administração da LM é adiada para D15 ou D30 para que haja tempo para a estabilização do mesmo antes de induzir o efeito microfilaricida, reduzindo assim a probabilidade de desenvolvimento de reacções adversas associadas à morte massiva de microfilárias (McCall et al, 2008a; Kramer et al, 2011).

As LM utilizadas ao longo do tratamento são a milbemicina oxima (Milbemax ®) ou a ivermectina (Heartgard ®) nas doses de 500 µg/kg e 6 µg/kg respetivamente, administradas por via oral.

Ao D60 é administrada nova dose de LM, acompanhada da primeira aplicação de melarsomina, caso o estado físico geral do animal e valores de d-dímero, entre outros exames complementares, o permitam. Salienta-se aos tutores a importância da restrição de exercício físico a partir desta fase (Figura 9).

Ao D90 repetem-se as administrações de lactona macrocíclica e adulticida, e 24 horas depois procede-se à terceira e última administração de adulticida. O repouso é recomendado por um período de 4 semanas após a última aplicação de adulticida.

O animal volta à clínica 6 meses depois da última administração de adulticida, onde se efectua o teste de antígeno circulante e institui-se a profilaxia anual com a suspensão injectável de microsferas de Moxidectina (Guardian®). Durante todo o período de tratamento, até à realização de novo teste, os animais fazem microfilaricidas mensalmente.

**Figura 9** – Exemplo de confinamento em canil para restrição de exercício físico após início da terapêutica adulticida. (Original)



### **2.3. Corticosteróides**

Animais assintomáticos, cujos valores de d-dímero se encontram dentro dos parâmetros normais e sem outras alterações analíticas ou radiográficas que o justifiquem, não são sujeitos à administração de corticosteróides.

A terapêutica com corticosteróides é considerada quando os animais apresentam sintomatologia evidente, sinais radiográficos de pneumonia alérgica eosinofílica (observada muito frequentemente em contexto clínico) ou outras alterações do parênquima pulmonar e valores de d-dímero elevados, optando-se pelo protocolo recomendado pela AHS (2018): Prednisolona 0,5 mg/Kg PO BID na primeira semana, 0,5 mg/Kg PO SID na segunda semana e 0,5 mg/Kg PO EOD na terceira e quarta semanas.

Para animais que já terminaram o protocolo referido acima no momento da administração de lactonas ou adulticida, opta-se por administrações únicas de dexametasona na forma injectável ou prednisolona na forma de comprimidos. Os tutores destes animais levam também para casa prednisolona em comprimidos para administração em caso de prostração, dispneia ou outras reacções adversas que possam ser mediadas apenas com esta medicação.



## **2.4. Exames complementares**

A altura da realização dos exames complementares de diagnóstico no decurso do tratamento não seguiu um protocolo estrito, variando consoante a apresentação clínica do animal, idade e disponibilidade financeira do tutor. Os exames complementares mais frequentemente realizados foram radiografia torácica, hemograma, análises bioquímicas (enzimas hepáticas, creatinina, ureia, albumina, proteínas totais, ionograma) e doseamento do d-dímero. Todos os exames complementares foram realizados na clínica, à excepção do doseamento do d-dímero, realizado no laboratório da DNATech®, Lisboa, Portugal. O doseamento laboratorial do d-dímero é efectuado no plasma sanguíneo em tubo de citrato e baseia-se numa análise imunoturbidimétrica potenciada por partículas. As amostras foram enviadas em tubo de citrato de sódio até um dia depois da colheita.

## **2.5. Análise estatística**

De modo a identificar possíveis factores de mau prognóstico, a análise estatística dos dados foi realizada recorrendo ao programa “R” versão 3.5.1. (The R Project for Statistical Computing, 2018), tendo sido utilizado o teste de Fisher para relacionar as diferentes variáveis de interesse com a morte e ocorrência de complicações no decorrer do tratamento. Este teste de hipóteses é preferido ao teste de qui-quadrado quando as frequências esperadas são muito baixas (Petrie & Watson, 2013). Os resultados foram avaliados com um intervalo de confiança de 95% e foi estabelecido um nível de significância de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **3. Resultados**

### **3.1. Variáveis em estudo**

Durante o período de estágio foram testados 40 animais, 24 dos quais apresentaram um teste antigénio positivo e foram incluídos no presente estudo. Registou-se assim uma prevalência de 60% de animais infectados com DCC no período de Setembro de 2017 a Janeiro de 2018.

Do total da amostra de cães seleccionada (N=43) desconhecia-se a proveniência de dois animais, pelo que a caracterização populacional da área geográfica de residência foi efectuada para 41 indivíduos. A maioria residia em Samora Correia (n=30) correspondendo a 73,2% da população, 22% (n=9) em Benavente e 4,8% em Santo Estevão (n=2). Relativamente ao sexo, 67% (n=29) dos indivíduos eram machos e 33% (n=14) eram fêmeas. O peso vivo variou entre 3,4 kg e 44,6 kg, sendo a média de 21,6 kg.

As idades variaram entre 1 e 12 anos de idade, sendo a média de 6,7 anos. No teste de Fisher compararam-se as variáveis idade  $\geq 7$  anos e morte do animal, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,6227$ ). Também não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre uma idade  $\geq 7$  anos e a ocorrência de complicações no decorrer do tratamento ( $p= 0.4307$ ).

O exame a fresco de uma gota de sangue foi realizado a 18 dos 43 animais, tendo-se verificado um resultado positivo para 55,6% (10/18) da população testada. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a existência de microfilarémia e morte ( $p=0,6471$ ) ou relativamente à ocorrência de complicações ao longo do tratamento ( $p=0,3382$ ).

Como dado adicional, um dos animais foi diagnosticado após visualização ao MO de uma microfilaria numa punção de aspiração por agulha fina a um nódulo subcutâneo. Não foi efectuada a identificação da mesma, no entanto o teste de pesquisa de antígeno revelou-se positivo para *D. immitis*.

**Figura 10** - Microfilária detectada em nódulo subcutâneo - coloração DiffQuick®; ampliação 16x (Original).



Quatro dos animais diagnosticados durante o período de estágio não efectuaram qualquer exame complementar e um dos tutores optou por não iniciar o tratamento.

Dos animais apresentados à consulta, 44% (19/43) encontravam-se assintomáticos. Ao exame físico, o achado mais frequente foi a existência de um sopro cardíaco, seguido de letargia, dispneia e palidez das mucosas. Os sintomas mais frequentemente exibidos foram a tosse e intolerância ao exercício, como demonstrado na tabela 4.

**Tabela 4** – Sinais clínicos detectados ao exame físico e sintomas reportados em consulta.

Variáveis clínicas	P	%
<b>Exame físico</b>		
Sopro cardíaco <sup>1</sup> (N=35)	8	22,9
Letargia (N=43)	4	9,3
Dispneia (N=43)	2	4,7
Mucosas pálidas (N=43)	2	4,7
Ascite (N=43)	1	2,3
<b>Sintomatologia reportada por tutores</b>		
Tosse (N=43)	13	30,2
Intolerância ao exercício (N=43)	9	20,9
Perda de peso (N=43)	4	9,3
Inapetência (N=43)	4	9,3
Hematúria (N=43)	2	4,7
Vômitos (N=43)	1	2,3
Hematoquêzia (N=43)	1	2,3

<sup>1</sup>Holossistólico de refluxo, mais audível no hemitórax direito.

Notas: N corresponde ao número de animais avaliados para as variáveis clínicas descritas e P aos que as apresentaram.

Os achados clínicos mais relevantes detectados durante a realização dos exames complementares de diagnóstico estão representados na Tabela 5 e foram a existência de padrões pulmonares mistos e cardiomegália à radiografia torácica, aumento das enzimas hepáticas Alanina aminotransferase (ALT) e AST, leucocitose, neutrofilia, eosinofilia e trombocitopénia no hemograma e elevação do valor de d-dímero (> 0,4 mg/L).

**Tabela 5** – Resultados dos exames complementares realizados.

Achados clínicos mais relevantes	P	%
<b>ECG (N=9)</b>		
<i>P pulmonale</i>	2	22,2
<i>P mitrale</i>	2	22,2
Ondas R voltagem aumentada	1	11,1
<b>RX tórax (N=20)</b>		
Padrão pulmonar misto	9	45
Cardiomegália <sup>1</sup>	8	40
Edema pulmonar peri-hilar	5	25
Dilatação artérias pulmonares	3	15
<b>Parâmetros laboratoriais</b>		
<b>Enzimas hepáticas elevadas</b>		
ALT (N=25)	10	40
AST (N=12)	4	33,3
ALP <sup>2</sup> (N=21)	4	19
<b>Ureia (N=25) (elevada)</b>	<b>4</b>	<b>16</b>
<b>Creatinina (N=27) (elevada)</b>	<b>2</b>	<b>7,4</b>
<b>Hemograma (N=24)</b>		
Leucocitose	6	25
Neutrofilia	6	25
Eosinofilia	6	25
Trombocitopénia	6	25
Policitémia	4	16,7
Linfopénia	4	16,7
Monocitopénia	2	8,3
Anemia	2	8,3
<b>d-dímero &gt; 0,4 (mg/L) (N=20)</b>	<b>9</b>	<b>45</b>

Notas: 1. Cardiomegália direita, esquerda ou generalizada. 2. Fosfatase alcalina.

Dos animais que efectuaram o doseamento do d-dímero, 45% (9/20) apresentaram valores acima do valor de referência estipulado.

As médias do doseamento de d-dímero realizado em diferentes fases do tratamento estão descritas na tabela 6.

**Tabela 6** – Valores independentes de todos os doseamentos de d-dímero efectuados ao longo do tratamento.

d-dímero (mg/L)				
D0 (N=10)	D30 (N=9)	D60 (N=8)	D90 (N=1)	D120 (N=1)
0,17	18,4	0,13	2,1	3,38
0,17	0,17	1,38		
0,18	0,17	0,29		
1,04	3,67	0,35		
1,57	0,41	1,03		
0,21	0,18	0,18		
0,18	1,03	0,34		
0,15	1,31	0,17		
3,4	14,11			
1,14				
<b>Média= 0,821</b>	<b>Média= 4,383</b>	<b>Média= 0,484</b>		

Notas: D0 corresponde ao dia do diagnóstico e início de tratamento, D30 refere-se a 30 dias decorridos do início do tratamento e assim sucessivamente. Os valores apresentados não correspondem a uma linha cronológica do mesmo paciente, servindo apenas para efeitos de obtenção de valores médios do biomarcador em diferentes fases do tratamento.

### 3.2. Medicação de suporte cardio-respiratório e hepático

Um total de 13 cães (30,2% da população total) necessitou de medicação de suporte cardio-respiratório, sendo o benazepril aplicado em todos os indivíduos, seguido da furosemida prescrita a 7 animais. O pimobendan foi administrado a apenas 2 animais e o sildenafil prescrito ao único cão que realizou ecocardiografia.

Quatro indivíduos necessitaram de medicação de suporte hepático, devido à elevação das enzimas hepáticas. Os fármacos utilizados (em alguns casos simultaneamente) foram a S-adenosil metionina, ácido ursodesoxicólico e silimarina.

### 3.3. Complicações no decorrer do tratamento

Dos animais que concluíram o tratamento até ao final do período de realização do presente trabalho, 37,5% (9/24) desenvolveram complicações que se resolveram com relativa facilidade. A mais frequente foi o agravamento da tosse (N=5), seguida de sintomas de tromboembolismo (N=2); um indivíduo sofreu um episódio de hemoptise após a

administração de uma lactona macrocíclica, outro apresentou hipotensão após a segunda administração de melarsomina e outro, para além do agravamento da tosse, exibiu dois episódios de lipotimia na primeira e segunda semanas após a última administração de melarsomina.

### **3.4. Estadiamento**

A divisão dos animais em grupos resultou na obtenção do grupo 1, correspondente ao estágio 1, constituído por 25 indivíduos, grupo 2 (estádio 2) (n=10), grupo 3 (estádio 3) (n=7) e grupo 4 (estádio 4) (n=1).

O teste de Fisher encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre animais que apresentavam um estágio  $\geq 3$  e a ocorrência de morte ( $p=0,016$ ). Não foi encontrado um valor-p significativo entre um estadiamento  $\geq 3$  e a ocorrência de complicações ao longo do tratamento ( $p=0.332$ ), nem quando comparado com valores de d-dímero elevados ( $> 0,40$  mg/L) ( $p=0,673$ ).

#### 4. Discussão

Neste estudo foi encontrada uma prevalência de DCC (60%) superior às observadas por outros autores (Cruz, R., 2012; Alho et al., 2014). O concelho de Benavente é um território rural subdividido em 4 freguesias (Barrosa, Benavente, Samora Correia e Santo Estevão) pertencente ao distrito de Santarém, onde existe uma grande tradição no cultivo do arroz e outras culturas de regadio devido à natureza hidromórfica dos seus solos. Em áreas significativas, os vales aluvionares ligados aos rios Tejo, Sorraia e Almansor funcionam como ilhas ao interromper a secura característica dos montados (Câmara Municipal de Benavente, 2018). Estas particularidades propiciam a existência de grandes superfícies de águas paradas, originando locais adequados para a reprodução em massa de populações de mosquitos autóctones ou recém-introduzidas (Alho et al., 2014). Existe ainda uma boa parte da população canina rural que vive permanentemente no exterior e não recebe assistência médico-veterinária, falhando a implementação de protocolos profiláticos. Para além do mais, a tendência de manter mais do que um animal de estimação nesta área provoca um decréscimo no poder económico dos tutores, gerando uma menor receptividade à profilaxia e tratamento da doença. Estes factores aliados às alterações climáticas poderão justificar a elevada prevalência de DCC encontrada.

A percentagem de animais microfilarémicos encontrada foi de 55,6%, em oposição aos valores referidos na literatura de 70-90% de microfilarémia numa população que não efectue qualquer profilaxia para a *D.immitis* (Venco, 2007; Ware, 2014; Atkins, 2017). Este resultado foi influenciado pelo facto de a pesquisa de microfilárias ter sido realizada exclusivamente através da realização do exame a fresco de uma gota de sangue, ao invés da utilização de técnicas de enriquecimento que têm a capacidade de aumentar a sensibilidade e especificidade da deteção das larvas (Genchi et al., 2007a).

A microfilária observada ao MO após punção por aspiração de agulha fina de um nódulo subcutâneo não foi identificada, podendo pertencer à espécie *D.immitis*, *D.repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* ou *Acanthocheilonema reconditum*. Para proceder à sua identificação teria de se recorrer ao TMK e à coloração histoquímica pela fosfatase ácida. No entanto o animal apresentava um teste antigénio positivo para *D.immitis* e estão descritas migrações aberrantes com larvas encontradas no tecido muscular (Atkins, 2017).

A percentagem de animais assintomáticos (44%) foi ao encontro do que está descrito por outros autores, sendo assumido que grande parte dos animais infectados não apresenta qualquer sintoma durante anos (Ware, 2014; Atkins, 2017). Este factor está relacionado com a típica evolução crónica da doença, responsável por muitas vezes os tutores surgirem com os seus animais à consulta quando estes apresentam uma idade mais avançada e sinais de comprometimento cardiorespiratório. Os sintomas mais frequentemente reportados pelos tutores neste estudo foram a tosse e intolerância ao exercício, sendo a tosse o principal

estímulo iatrotópico quando o diagnóstico não era feito em âmbito de consulta profilática. O achado mais frequente ao exame físico foi o sopro cardíaco, seguido de letargia, dispneia e palidez das mucosas, em concordância com a literatura consultada (Calvert & Thomason, 2007).

O ECG foi realizado numa pequena amostra de animais por não ser considerado um exame prioritário e pela reduzida disponibilidade financeira dos tutores. A presença de alterações no ECG de animais infetados com DCC varia segundo vários estudos entre 6% a 62%, sendo que neste estudo foram detectadas em 44,4% dos traçados analisados. Os achados *P pulmonale* e *P mitrale* estavam presentes em 22,2% dos exames, o que não está de acordo com alguns autores que consideram o achado *P-pulmonale* pouco comum na DCC (Atkins, 2017).

O exame ecocardiográfico foi realizado em consulta com um médico veterinário cardiologista externo, a apenas um animal. Este cão, macho inteiro de 12 anos de idade, apresentava dilatação ventricular/atrial direita moderada, dilatação do tronco pulmonar com imagem suspeita da presença de parasitas adultos na sua bifurcação e regurgitação da tricúspide sugestiva de HP moderada. Segundo Venco et al. (2003) estes achados sugerem uma maior probabilidade de o animal possuir uma elevada carga parasitária. Este indivíduo possuía sinais radiográficos de edema peri-hilar, na projecção VD observou-se um nódulo no segmento caudal do lobo cranial esquerdo que poderia ser compatível com um granuloma eosinofílico parasitário e a única sintomatologia reportada pelos tutores era tosse moderada (Figura 7 no anexo I). A DCC é uma causa importante de HP em áreas onde esta parasitose é endémica. Uma vez que só é possível obter um diagnóstico definitivo de HP através da ecocardiografia, este exame deveria ser realizado em todos os animais com sinais clínicos, sintomas ou alterações radiográficas sugestivas de comprometimento da vascularização pulmonar ou da função cardíaca. Ao indivíduo em causa foi prescrito Sildenafil que iniciou um mês antes da terapêutica adulticida e continuou até um mês depois da última injeção. Durante este período restringiu-se o exercício físico e não foram notados quaisquer sinais de dispneia, tosse ou letargia, à excepção de dois episódios de lipotimia na primeira e segunda semana (período descrito na literatura como de maior probabilidade da ocorrência de TP) (Ware, 2014).

Dos 43 animais que participaram no estudo, apenas 20 realizaram radiografia torácica, sendo por norma efectuadas duas projecções (LL e VD). Este exame complementar era recomendado a todos os animais infectados e a única limitação foi a restrição financeira dos proprietários, justificando também por vezes a realização de apenas uma projecção. Segundo Venco, L. (2007) as alterações radiográficas estão presentes em aproximadamente 85% dos casos de infecção por DCC, coincidindo com os resultados



obtidos neste estudo em que apenas 20% (4/20) dos indivíduos apresentava radiografias sem alterações dignas de registro.

A presença de padrões pulmonares mistos foi observada em 45% (9/20) das radiografias, tratando-se sobretudo de padrões mistos compatíveis com pneumonia alérgica eosinofílica. Este resultado é discrepante com os de Losonsky et al. (1983) em que as alterações mais frequentes foram a dilatação do ventrículo direito, artéria pulmonar principal e artéria cranial do lobo pulmonar direito.

A cardiomegalia foi a segunda alteração mais frequente, observada em 40% (8/20) dos animais. No entanto não foi possível diferenciar em direita, esquerda ou generalizada em todas as radiografias, porque esse critério não se encontrava especificado em algumas das fichas clínicas consultadas. No entanto, das radiografias a que foi possível ter acesso, observou-se que pelo menos 37,5% dos animais (5/14) apresentavam o sinal radiográfico de silhueta cardíaca em forma de “D invertido”, característico do aumento do VD (Anexo I).

Relativamente aos parâmetros laboratoriais estudados, a elevação das enzimas hepáticas foi o mais significativo. A ALT encontrava-se elevada em 40% (10/25) das amostras analisadas, um valor muito superior ao descrito na bibliografia, em que tipicamente apenas 5 a 10% dos animais exibe esta alteração (Alonso & Gómez, 2012). Apenas um dos animais avaliados relativamente a este parâmetro realizou ecografia hepática onde foram encontrados sinais compatíveis com mucocelo biliar, justificando a interferência com o resultado obtido. Outro fator a ter em conta é que a maioria destes animais (7/10) tinha entre 8 e 12 anos de idade, aumentando a probabilidade da existência de comorbilidades não diagnosticadas que poderiam justificar os valores encontrados, tais como hipotireoidismo, híper/hipoadrenocorticism, pancreatite, prostatite ou neoplasia (German & Hall, 2016; Atkins, 2017). A AST encontrava-se elevada em 33,3% (4/12) da amostra doseada, e é interessante notar que o seu aumento pode refletir não só uma hepatopatia, como uma lesão miocárdica.

Elevações da ureia foram detectadas em 16% (4/25) dos animais e da creatinina em 7,4% (2/27). Este resultado não é muito diferente do descrito por Alonso & Gómez (2012), com menos de 5% dos cães infectados a sofrer estes aumentos. Um dos animais afectados sofria de SVC e faleceu um dia após o internamento, e outro foi diagnosticado com um quadro de nefropatia e faleceu três semanas após o internamento. Os restantes recuperaram após um breve período de fluidoterapia.

No hemograma foram registadas em igual proporção leucocitose, neutrofilia, eosinofilia e trombocitopenia. Segundo Ware, (2014) estes achados são comuns mas inconsistentes. De acordo com Alonso & Gómez (2012) a eosinofilia está presente em 85% a 95% dos animais,

e neste estudo foi encontrada em apenas 25% (6/24) da amostra. Este resultado pode dever-se ao facto de alguns destes animais terem realizado o hemograma após a toma de um microfilaricida e de um ciclo de doxiciclina, reduzindo assim a microfilarémia e a intensidade da resposta imunitária. A anemia foi um achado pouco frequente, em apenas 8,3% (2/24) dos animais e era normocrómica normocítica, tal como descrito na bibliografia. Alonso & Gómez (2012) descrevem a dirofilariose como a causa mais frequente de basofilia em regiões endémicas, no entanto nenhum animal apresentou basofilia e talvez o reduzido tamanho da amostra (n=24) possa ter contribuído para este resultado, embora não deixe de ser um dado a ter em conta para futuras investigações que explorem este parâmetro sanguíneo em animais com DCC.

Neste estudo 45% (9/20) dos animais que efectuaram o doseamento do d-dímero apresentaram pelo menos um valor plasmático superior ao de referência ( $> 0,4$  mg/L), ao longo do período de tratamento (Tabela 5). No D0, 40% dos animais apresentou valores de d-dímero elevados, à semelhança de achados em estudos anteriores que reportam níveis elevados em 47%, 34,8% e 40% dos indivíduos, antes de iniciar o tratamento, e que enquadram perfeitamente os nossos resultados (Carréton et al., 2011; 2012; 2013b).

A média dos valores de d-dímero registada no D0 (0,821) foi bastante inferior à do D30 (4,383) (Tabela 6). O aumento do valor do d-dímero no D30 poderia reflectir a uma reacção microfilaricida intensa provocada pela primeira administração de lactonas macrocíclicas entre o D0 e D15. No entanto Grandi et al., (2010) observaram que 30 dias após a toma diária de doxiciclina e duas tomas de ivermectina, 37,5% da população em estudo se tornou amicrofilarémica. Ao D60 a percentagem de animais amicrofilarémicos subiu para 87,5% e ao D90 para 100%, sugerindo uma morte parasitária mais significativa entre o D30 e o D60. Carréton et al., (2013b) verificaram uma descida dos níveis de d-dímero no D60, relativamente ao D0, à semelhança deste estudo, onde a média passou de 0,821 no D0 para 0,484 no D60. A acção conjunta da ivermectina e doxiciclina é a justificação mais fundamentada para estas variações, uma vez que é provável que a redução da massa antigénica por estes fármacos diminua a gravidade dos fenómenos tromboembólicos (Bazzocchi et al., 2008; Kramer et al., 2008; 2011). É importante ainda ter em conta que o d-dímero não é um biomarcador específico do TP, que pode surgir aumentado após a clivagem de qualquer coágulo (Carréton et al., 2017b). Este facto torna ainda mais difícil justificar as variações observadas.

Estudos conduzidos por Carréton et al., (2011; 2012; 2013b) reportaram que cães microfilarémicos apresentaram níveis mais elevados de d-dímero. Infelizmente, no presente estudo não foi possível determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a microfilarémia e valores elevados de d-dímero dado que apenas um indivíduo cumpriu os critérios necessários a esta avaliação: realização do doseamento do d-dímero e

exame a fresco de uma gota de sangue no D0. O mesmo se verificou para a pesquisa de uma correlação entre trombocitopenia e d-dímero elevado, devido ao desfasamento temporal entre a realização das análises. Uma vez que a trombocitopenia poderá representar o consumo plaquetário durante o processo de tromboembolismo e é um indicador sugestivo de CID, fará sentido procurar uma associação entre as duas variáveis (Feldman et al., 2000). No entanto esta ainda não foi provada (Nelson & Andreasen, 2003; Carréton et al., 2013b; Ferreira, 2015).

A identificação de determinadas variáveis enquanto factor de prognóstico é importante na compreensão da biologia e história natural de uma doença, permite a optimização de estratégias terapêuticas e é uma ferramenta importante para a construção e análise de ensaios clínicos (Schumacher et al., 2006). Para a pesquisa de factores de mau prognóstico na população em estudo foram consideradas determinantes as variáveis morte e ocorrência de complicações no decorrer do tratamento.

Apenas foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um estágio  $\geq 3$  e a morte ( $p=0,016$ ). Na bibliografia a ocorrência de fenómenos como CID, SVC, embolismos pulmonares massivos, granulomatose eosinofílica, doença arterial pulmonar grave e insuficiência cardíaca estão descritos como os factores que mais afetam o prognóstico (Atkins, 2017). Alguns destes fenómenos passam frequentemente despercebidos e são de difícil diagnóstico. Assim, optou-se pela selecção do critério “estágio de doença  $\geq 3$ ” como forma de representação destes factores de maior influência no resultado final (morte/sobrevivência), considerando que qualquer evidência da sua ocorrência levaria à classificação do indivíduo num estágio  $\geq 3$  (Atkins, 2017).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre uma idade  $\geq 7$  anos e a morte, apesar de a taxa de mortalidade ser superior no grupo de animais com mais de 7 anos ( $p=0,622$ ), nem entre mais nenhuma das variáveis estudadas. O facto de ter ocorrido um baixo número de mortes ( $n=4$ ) durante o período de realização do estudo e um relativo baixo número de complicações ( $n=9$ ), aliado à reduzida dimensão da amostra, poderá ter limitado a determinação dos factores de mau prognóstico.

Não foi possível determinar se um valor de d-dímero elevado poderia constituir um factor de mau prognóstico através da correlação das variáveis d-dímero  $> 0,4$  mg/L e morte do animal, uma vez que apenas um dos animais o efectuou antes de falecer.

Uma grande limitação deste trabalho foi a impossibilidade de realizar todos os exames complementares relevantes para o estudo da DCC, a todos os indivíduos e na mesma fase do tratamento. Tipicamente, os animais com sintomatologia exuberante realizaram exames complementares no momento do diagnóstico visando a sua estabilização, ao passo que os assintomáticos os efectuaram ao longo do período de tratamento, variando entre 1 mês

após o início do mesmo até 1 mês antes da primeira administração de melarsomina. Ainda assim, há que considerar que a bateria de exames variava de acordo com a disponibilidade financeira de cada tutor. Tendo isto em conta, nem todos os animais realizaram todos os exames complementares necessários para um estadiamento preciso e a classificação foi efectuada com base na adaptação dos achados clínicos disponíveis.

Teria sido muito importante também incluir a avaliação ecocardiográfica de todos os animais e a quantificação dos níveis de antígenos circulantes para melhor estimar a carga parasitária e diagnosticar quadros de HP, mas as limitações financeiras inerentes ao custo destes exames não permitiu a sua execução.

## 5. Conclusão

A elevada prevalência da DCC encontrada neste estudo, 60% de cães da amostra com DCC, indica que esta doença assume um padrão epidemiológico de propagação para novas áreas e hiperendemicidade nas já afetadas.

Verifica-se ainda alguma relutância por parte dos tutores em realizar a profilaxia da DCC por a considerarem de custo relativamente elevado, principalmente para cães de grande porte. Há também alguma tendência para a falta de observância do recomendado pelo médico veterinário no que respeita ao cumprimento dos programas profiláticos e de tratamento e um crescente problema de sobrepopulação e abandono no concelho de Benavente. Todos estes factores contribuem para a proliferação do parasita e perpetuação da transmissão.

Os achados clínicos foram ao encontro do que está descrito por outros autores, com um maior destaque dos padrões pulmonares mistos na radiografia torácica.

Os resultados obtidos sugerem que um estadiamento igual ou superior a 3 na altura do diagnóstico constituiu um factor de mau prognóstico na população em estudo. No entanto, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre nenhuma das outras variáveis analisadas, provavelmente devido ao reduzido tamanho da amostra e ausência de padronização nos exames complementares realizados.

Para investigações futuras seria interessante desenhar um estudo com um grupo de controlo para a análise de factores de risco para a DCC e uma padronização da mesma bateria de exames complementares realizada em todos os indivíduos na mesma fase de tratamento. O estudo da determinação do valor preditivo dos biomarcadores na probabilidade de desenvolvimento de TP e na avaliação das lesões cardíacas induzidas por esta doença é uma área em desenvolvimento que poderá auxiliar bastante o manejo médico dos animais infectados. A actualização de uma tabela de estadiamento que contemplasse os valores de biomarcadores como o d-dímero e troponinas torná-lo-ia ainda mais preciso.

## V. Bibliografia

- American Heartworm Society (AHS). (2018). *Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs*. Acedido em Setembro, 17, 2018, disponível em: <https://www.heartwormsociety.org/images/pdf/2018-AHS-Canine-Guidelines.pdf>
- Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Goncalves, L., Belo, S. & Carvalho, L. M. (2013). Prevalência da Dirofilariose canina na região centro de Portugal. *VIII Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários, comunicação livre*.
- Alho, A. M., Meireles, J., Belo, S. & Carvalho, L. M. (2014). *Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I) – etiologia, biologia e epidemiologia*. *Clínica Animal*, 25(1), 20–25.
- Alho, A. M., Fiarresga, A., Landum, M., Lima, C., Gamboa, O., Meireles, J., Sales Luís, J. & Madeira de Carvalho, L. (2016). A Homemade Snare: An Alternative Method for Mechanical Removal of *Dirofilaria immitis* in Dogs. *Veterinary Medicine International*, 5780408.
- Alho, A. M. (2017). *Dirofilaria immitis* and *angiostrongylus vasorum*: epidemiology and impact of major heartworms in carnivores in Portugal. Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na Especialidade de Sanidade Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Alonso, J. A. M. & E. C. Gómez, E. C. (2012). *Dirofilariosis cardiopulmonar canina*. In E. Carréton, R. Morchón & J. A. M. Alonso (Eds.), *Dirofilariosis: Pautas de Manejo Clínico*. (pp. 1 – 25). Barcelona: Multimédia Ediciones Veterinarias.
- Apifarma. (2018). *Simposium veterinário: medicamentos e produtos de saúde animal*. Acedido em Maio 16, 2018, disponível em: <http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx>
- Atkins, C. (2013). NSAIDs & anticoagulants – use in management of heartworm infection. *Today's Veterinary Practice*, 3, 47–52.
- Atkins, C. (2017). *Canine Heartworm Disease*. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed.) (pp. 3166–3228). Saunders.
- Bazzocchi, C., Mortarino, M., Grandi, G., Kramer, L.H., Genchi, C., Bandi, C., Genchi, M., Sacchi, L. & McCall, J.W. (2008). Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International Journal for Parasitology*, 38, 1401–1410.
- Bové, C.M., Gordon, S.G., Saunders, A.B., Miller, M.W., Roland, R.M., Achen, S.E., Drouin, L.T. & Boggess, M.M. (2010). Outcome of minimally invasive surgical treatment of heartworm caval syndrome in dogs: 42 cases (1999-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(2), 187-192.

- Bowman, D. & Atkins, C. (2009). Heartworm biology, treatment, and control. *Veterinary Clinics North America Small Animal Practice*, 39 (6), 1127–58.
- Bowman, D. (2012). Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. *Parasites & Vectors* 5, 138.
- Bowman, D. & Drake, J. (2017). Examination of the “susceptibility gap” in the treatment of canine heartworm. *The Author(s) Parasites & Vectors*, 10(2), 513.
- Calvert, C. A. & Rawlings C. A. (1988). Canine heartworm disease. In *Canine and feline cardiology*. (pp. 551-549). New York: Churchill Livingstone.
- Calvert, C. A., & Thomason, J. D. (2007). *Heartworm Disease*. In L. P. Tilley, F. W. K. Smith Jr., M.A. Oyama, & M. M. Sleeper (Eds.), *Manual of Canine and Feline Cardiology* (4th ed.) (pp. 464). Saunders.
- Câmara Municipal de Benavente (2018). Informação geográfica – Território e Ambiente. Acedido em Março, 5, 2018, disponível em: [http://www.cm-benavente.pt/index.php?option=com\\_k2&view=item&layout=item&id=59&Itemid=311](http://www.cm-benavente.pt/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=59&Itemid=311)
- Cancrini, G., Frangipane, R., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., & Pietrobelli, M. (2003). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet. Parasitol.* 118, 195–202.
- Cancrini, G. & Gabrielli, S. (2007). Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behavior and host/parasite relationships. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Ed), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. (pp. 211). Naples: Rolando Editore.
- Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira de Carvalho, L. (2012). *Prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Leishmania infantum in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study*. *Parasites & Vectors*, 5(1), 62.
- Carretón, E., Corbera, J. a., Juste, M. C., Morchón, R., Simón, F., & Montoya-Alonso, J. A. (2011). *Dirofilaria immitis* infection in dogs: Cardiopulmonary biomarker levels. *Veterinary Parasitology*, 176, 313–316.
- Carretón, E., Grandi, G., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A. M. (2012). Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 189(2–4), 390–3.
- Carretón, E., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A. M. & Kramer, L. (2013a). *D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (dirofilaria immitis) disease*. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), 182–186.
- Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M. C., & Montoya-Alonso, J. A. (2013b). *Variation of d-dimer values as assessment of pulmonary*

*thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs. Veterinary Parasitology, 195 (1-2), 106–111.*

- Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Juste, M. C., Simón, F., Montoya-Alonso, J. A. (2013c). Utility of cardiac biomarkers during adulticide treatment of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Veterinary Parasitology, 197*(1–2), 244–50.
- Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M. C., Méndez, J. C., & Montoya-alonso, J. A. (2014a). *Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine dirofilariosis. Veterinary Parasitology, 206*, 43–47.
- Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M. C., & González-Miguel, J. (2014b). *Veterinary Parasitology Evaluation of cardiopulmonary biomarkers during classic adulticide treatment versus the American Heartworm Society recommended treatment protocol in dogs infected by Dirofilaria immitis. Veterinary Parasitology, 206*(1-2), 55–59.
- Carretón, E., Cerón, J. J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caro-Vadillo, A. & Montoya-Alonso, J. A. (2017a). Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm infected dogs. *The Author(s) Parasites & Vectors, 10*(2), 477.
- Carréton, E., Morchón, R. & Montoya-Alonso, J. A. (2017b). Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in heartworm disease. *The Author(s) Parasites & Vectors, 10*(2), 534.
- Chandrashekar, R., Beall, M. J. & Saucier J. (2014). Experimental *Dirofilaria immitis* infection in dogs: effects of doxycycline and Advantage Multi administration on immature adult parasites. *Veterinary Parasitology, 206*, 93–98.
- Cruz, R. L. (2012). *Dirofilariose canina. Relatório de Estágio Curricular do Domínio Fundamental. Universidade de Évora*
- Di Sacco, B. & Vezzoni, A. (1992). Clinical classification of heartworm disease for the purpose of adding objectivity to the assessment of therapeutic efficacy of adulticidal drugs in the field. In Sol MD (ed): *Proceedings of the Heartworm Symposium*. Batavia, IL: American Heartworm Society, 209- 214.
- Dingman, P., Levy, J. K., Kramer, L. H., Johnson, C. M., Lappin, M. R., Greiner, E. C., Courtney, C. H., Tucker, S. J. & Morchón, R. (2010). *Association of Wolbachia with heartworm disease in cats and dogs. Veterinary Parasitology, 170*(1-2), 50–60.
- Direção Geral da Saúde (2018). Acedido em Novembro, 28, 2018, disponível em: <https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/aedes-albopictus-mosquito.aspx>
- Dzimianski, M. T., McCall, J. W. & Steffens W. L. (2001). The safety of selamectin in heartworm infected dogs And its effect on adult worms and microfilariae. Seward L. *Proceedings of the 2001 American Heartworm Symposium. American Heartworm Society: Batavia, IL, 55*, 135–140.



- Dzimianski, M. T., McCall, J. W., Roberts, R., McCall, S. D., Kramer, L. H., Genchi, C., Guerrero, J., Mansour, A., Supakorndej, N., Supakorndej, P. (2006). Effects of ivermectin and doxycycline administered alone, together, or together plus melarsomine against adult *D. immitis* in dogs with induced infections: Clinical observations. In Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists, 51st Annual Meeting. 15–18 July, Abstract No. 66.
- ESCCAP (2012). Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. Guideline 5 (2nd ed).
- Feldman, B.F., Kirby, R., Caldin, M., (2000). Recognition and treatment of disseminated intravascular coagulation, In: J. D. Bonagura.(Ed.), Kirk's Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice (13th ed). WB Saunders Co., Philadelphia, pp. 190–194.
- Ferreira, C. A. C., Mixão, V. P., Novo, M. T. L. M., Calado, M. M. P., Gonçalves, L. A. P., Belo, S. M. D., & Almeida, A. P. G. (2015). *First molecular identification of mosquito vectors of Dirofilaria immitis in continental Portugal*. Parasites & Vectors, 8, 139.
- Ferreira, J. P. C. (2015). Doseamento do d-dímero como método de diagnóstico de tromboembolismo pulmonar em cães com dirofilariose cardíaca em Portugal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N. (2011) New Insights into the Evolution of Wolbachia Infections in Filarial Nematodes Inferred from a Large Range of Screened Species. In *Fonte Boa, 27-29 de Novembro 2008*, 89, 197.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G. (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet Parasitol.* 133 (2-3), 137-148.
- Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J.W. & Venco, L. (2007a). Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. In: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), *Mappe Parassitologiche* 8. Rolando Editore Naples.
- Genchi, C., Venco, L., & Genchi, M. (2007b). *Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline Dirofilaria infections*. Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria Immitis* and *D. Repens* in Dog and Cat and Human Infections, 138–14.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 286–292.
- German, A. J. & Hall, E. J. (2016). Laboratory evaluation of hepatic disease .In E. Villiers & J. Ristic (Eds.) *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* (3rd ed.) (pp. 237 – 261). British Small Animal Veterinary Association
- Goggs, R., Benigni, L. & Fuentes, V.L. (2009). Pulmonary thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency Critical Care*, 19(1), 30–52
- Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G., Kramer, L. (2010). A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *ItalyVeterinary Parasitology*, 169, 347–351.

- Grauer, G. F. (2001). Pathogenesis of heartworm-induced glomerulonephritis. In *Proceedings of the American Heartworm Symposium: Recent Advances in Heartworm Disease*, pp. 7-12.
- Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge (2018). Acedido em Novembro, 28, 2018, disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/09/2017.09.21-IRJ-identifica-Aedes-albopictus.pdf>
- Ishihara, K., Kitagawa, H. & Sasaki, Y. (1988). Efficacy of heartworm removal in dogs with dirofilarial hemoglobinuria using flexible alligator forceps. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 50, 739-745.
- Kramer, L. & Genchi, C. (2014). Where are we with Wolbachia and doxycycline: an in-depth review of the current state of our knowledge. *Veterinary Parasitology*, 206, 1–4.
- Kramer, L. H. (2006). Treating canine heartworm infection. *North America Veterinary Conference. In Clinician's Brief*. 4, 19–20.
- Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C., Mortarino, M., Bazzocchi, C. (2008). Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Parasitol.* 158, 191, 195.
- Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimianski, M. T. (2011). Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Vet Parasitol.* 176(4), 357, 60.
- Landum, M., Ferreira, C. C., Calado, M., Alho, A. M., Maurício, I. L., Meireles, J. S., Carvalho, L. M. de, Cunha, C., Belo, S. (2014). *Detection of Wolbachia in Dirofilaria immitis infected dogs in Portugal*. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 407–410.
- Langhorn, R. & Willeesen, J. L. (2016). Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 36–50.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D. & Otranto, D. (2012a). A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Vet. Parasitol.* 185:181–185.
- Latrofa, M. S., Weigl, S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E. & Otranto, D. (2012b). A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Trop.* 122:150 –154.
- Lee, S. G., Moon, H.-S. & Hyun, C. (2008a). Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heart worm (*Dirofilaria immitis*) infestation. *Journal of Veterinary Science*, 9(2), 197–202.
- Lee, S. A., Lee, S.G., Choi, E.J. & Hyun, C. (2008b). Prevalence of the endosymbiont Wolbachia in heartworms (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary Record*, 163, 484–486.

- Lombard, C. W. & Ackerman, N. (1984). Right heart enlargement in heartworm infected dogs. A radiographic, electrocardiographic, and echocardiographic correlation. *Vet Radiol* 25, 210.
- Losonsky, J. M., Thrall, D. E., & Lewis, R. E. (1983). *Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation*. *Veterinary Radiology*, 24(3), 120,123.
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J. & Deplazes, P. (2013). Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6:48.
- Martin, C. & Gavotte, L. (2010) The bacteria *Wolbachia* in filariae, a biological russian dolls' system: new Trends in antifilarial treatments. *Parasite*. 17, 79-89
- Mavropoulou, A., (2014). Clinical assessment of post-adulticide complications in *Dirofilaria immitis*-naturally infected dogs treated with doxycycline and ivermectin. *Vet. Parasitol.*
- McCall, J. W., Suprakorndej, P., Dzimiński, M. T. (2001a). Evaluation of retroactive and adulticidal activity of moxidectin canine SR (sustained release) injectable formulation against *Dirofilaria immitis* in beagles. In *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium*. 165,172.
- McCall, J.W.,Guerrero,J.,& Roberts, R. E. (2001b). *Further evidence of clinical prophylactic, retroactive (reach-back) and adulticidal activity of monthly administrations of ivermectin (Heartgard Plus) in dogs experimentally infected with heartworms*. In *Recent advances in heartworm disease* (pp. 189–200).
- McCall, J. W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimiński, M. T., Supakorndej, P., Mansour, A. M., McCall, S. D., Supakorndej, N., Grandi, G. & Carson, B. (2008a). Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implications. *Vet Parasitol.* 158, 204-214.
- McCall, J. W, Genchi, C., Kramer, L. H. (2008b). Heartworm disease in animals and humans. In Rollinson D, Hay SI (Eds): *Advances in Parasitology*. New York: Academic Press, 193,285.
- McCall, J. W., Kramer, L., Genchi, C. (2014). Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Vet Parasitol.* 206(1–2), 5,13.
- McHaffie, J. (2012) *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitology Research*, 110, 499–502.
- Miller, M.W., Keister, D. M.,Tanner, P. A. (1995). Clinical efficacy of melarsomine dihydrochloride (RM340) and thiacetarsamide in dogs with moderate (class 2) heartworm disease. M. D. Soll & D. H. Knight In *Proceedings of the 1995 American Heartworm Symposium*. American Heartworm Society: Batavia, IL, 233–241.

- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel J. & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe – New Distribution Trends. *Frontiers Physiology*, 3, 196.
- Nelson, C. T. (2015). AHS heartworm hotline: canine heartworm disease, principles of treatment. *Today's Veterinary Practice*, 5(2), 53,59.
- Nelson, C. T., McCall, J. W., Rubin, S. B., Buzhardt, L. F., Doiron, D. W., Graham, W., Longhofer, S. L., Guerrero, J., Robertson-Plouch, C., Paul, A. (2005a). Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 133, 267-275.
- Nelson, C. T., Myrick, E.S. & Nelson, T. A. (2017). Clinical benefits of incorporating doxycycline into a canine heartworm treatment protocol. *The Author(s) Parasites & Vectors*, 10 (2), 515.
- Nelson, O. L, Andreasen C. (2003). The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 830,4.
- Nelson, O. L. (2005b) Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 41(3), 145,9.
- Panteghini M., Bunk D. M., Christenson R. H., Katrukha A., Porter R. A., & Schimmel H. (2008) Standardization of troponin I measurements: an update. *Clin Chem Lab Med*. 46,1501,6.
- Papich, M. G. (2017). Considerations for using minocycline vs doxycycline for treatment of canine heartworm disease. In 15th American Heartworm Society Triennial Symposium New Orleans, LA, USA. September. *The Author(s) Parasites & Vectors*, 10 (2), 49
- Petrie, A. & Watson, P. (2013) *Statistics for Veterinary and Animal Science*. (3rd ed.) (pp. 351). John Wiley & Sons, Ltd Wiley-Blackwell.
- Poole, C. B., Grandea, A. G., Maina, C. V., Jenkins, R. E., Selkirk, M. E. & McReynolds, L. A. (1992). Cloning of a cuticular antigen that contains multiple tandem repeats from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:5986 –5990.
- Rossi, M., Aguiar-Alves, F., Santos, S., Paiva, J., Bendas, A., Fernandes, O. & Labarthe, N. (2010). Detection of Wolbachia DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Experimental Parasitology*, 126, 270–272.
- Schumacher M., Hollander N., Schwarzer G., Sauerbrei W. (2006). Prognostic factor studies. In: J. Crowley, D. P. Ankerst (Eds). *Handbook of Statistics in Clinical Oncology*. (2nd ed.) Boca Raton, FL: Chapman & Hall. pp. 289–333.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and Animal *Dirofilaria immitis*: the Emergence of a Zoonotic Mosaic *Clin. Microbiol.* 25(3), 507.

- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal *Dirofilariasis*: the emergence of a zoonotic mosaic. In *Clinical Microbiology Reviews (CMR)*, 25(3), 507-544.
- Small, M.T., Atkins, C.E., Gordon, S.G., Birkenheuer, A.J., Booth-Sayer, M.A., Keene, B.W., Fujii, Y. & Miller, M.W. (2008). Use of a nitinol gooseneck snare catheter for removal of adult *Dirofilaria immitis* in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(9), 1441–1445.
- Stuijver, D.J., Majoor, C. J., Zaane, B., Souverein, P.C., Boer, A. & Dekkers, O.M. (2013). Use of oral glucocorticoids and the risk of pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Chest*, 143(5), 1337–42.
- Tabar, M. D., L. Altet, V. Martínez & X. Roura (2013). *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. *Journal of Small Animal Practice*.
- Tamarozzi, F., Tendongfor, N., Enyong, P. A., Esum, M., Faragher, B., Wanji, S., Taylor, M. J. (2012) Long term impact of large scale community-directed delivery of doxycycline for the treatment of onchocerciasis. *Parasites & Vectors*, 5, 53.
- Taylor, M. J., Voronin, D., Kelly L. Ford, J. & Ford, L. (2012) *Wolbachia* filarial interactions. *Cellular Microbiology* 15(4), 520–526
- Taylor, M.J., Bandi, C. & Hoerauf, A. (2005). *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology*, 60, 248-286.
- Thomas, C. J. & Woods, R. L. (2003). Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(5–6), 369–75.
- Uchide, T. & Saida, K. (2005). Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(11), 1155–61.
- Urano Vet SL. (2018). Urano Vet Barcelona. Acedido em Junho 3, 2018, disponível em: <https://uranovet.com/uranotest/dirofilariosis/>
- Vanderheyden, M., Bartunek & J., Goethals, M. (2004). Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *European Journal Heart Failure*, 6(3), 261–8.
- Venco, L. (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.), *Mappe Parassitologiche* 8. Naples: Rolando Editore.
- Venco, L., Bertazzolo, W., Giordano, G. & Paltrinieri, S. (2014). Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Vet Parasitol.*, 206(1–2), 48–54.
- Venco, L., Genchi, C., Vigevani Colson, P. & Kramer, L. (2003). Relative utility of echocardiography, radiography, serologic testing and microfilariae counts to predict adult worm burden in dogs naturally infected with heartworms. In: L.E. Seward & D. H. Knight (Eds), *Recent Advances in Heartworm Disease. Symposium '01*. American Heartworm Society. Batavia, IL, 111-124 pp.

- Vezzoni, A., Genchi, C. & Raynaud, J-P. (1992). Adulticide efficacy of RM 340 in dogs with mild and severe natural infections. Soll MD. *Proceedings of the 1992 American Heartworm Symposium*. American Heartworm Society: Batavia, IL; 1993:231.
- Vieira, A. L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simoes, A.R., Diez-Banos, P. & Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*, 21, 5.
- Ware, W. A., (2014). Heartworm Disease. In R. W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Small animal internal medicine*. (5th ed.). (pp. 173 – 184). Missouri: Elsevier.
- Wells, S. M. & Sleeper, M. (2008). Cardiac troponins. *Journal Veterinary Emergency Critical Care*, 18, 235–45.
- Yoon, H.Y., Jeong, S.W., Kim, J.Y., Han, H.J., Jang, H.Y., Lee, B. & Namkung, H.S. (2005). The efficacy of surgical treatment with flexible alligator forceps in dogs with heartworm infection. *Journal of Veterinary Clinics*, 22, 309–313.
- Yoon, W., Kim, Y., Suh, S., Choi, R., Lee, S. & Hyun, C. (2017). Evaluation of cardiopulmonary and inflammatory markers in dogs with heartworm infection during treatment with the 2014 American Heartworm Society recommended treatment protocol. *The Author(s) Parasites & Vectors*, 10(2), 535.

# Anexo I

Tabela descritiva de todos os casos clínicos incluídos no estudo

Paciente	Idade (Anos)	Peso (kg)	Sexo	Data de diagnóstico	Exame a fresco da gota de sangue	Assintomático na altura do diagnóstico <sup>1</sup>	Periodicidade no protocolo de tratamento <sup>2</sup>	Morte <sup>3</sup>	Estádio clínico (1 – 4)
1	5	23,5	Masculino	15/09/2015	NA	Sim	Não	Não	1
2	12	18,6	Masculino	19/05/2016	Negativo	Não	Não	Não	2
3	3	29	Masculino	26/09/2016	NA	Não	Não	Não	2
4	3	36,8	Masculino	28/09/2016	NA	Não	Sim	Não	2
5	7	16,2	Masculino	01/10/2016	NA	Não	Não	Não	1
6	8	12	Masculino	10/10/2016	NA	Não	Sim	Não	2
7	10	34	Masculino	20/10/2016	Positivo	Não	Sim	Não	3
8	2	33	Feminino	06/01/2017	NA	Sim	Não	Não	1
9	10	30	Masculino	13/01/2017	NA	Não	Não	Não	1
10	9	20,75	Feminino	11/02/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
11	9	16,8	Masculino	27/02/2017	NA	Não	Não	Não	2
12	10	14,9	Feminino	13/03/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
13	8	20	Feminino	20/03/2017	NA	Sim	Não	Não	1
14	5	9,2	Masculino	05/04/2017	NA	Sim	Não	Não	1
15	5	7,4	Masculino	28/04/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
16	9	27	Masculino	17/05/2017	NA	Não	Não	Não	3
17	4	8,8	Masculino	17/05/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
18	4	35	Masculino	22/05/2017	NA	Não	Sim	Não	1
19	1	42,8	Masculino	13/06/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
20	1	23,2	Masculino	03/08/2017	NA	Não	Sim	Não	1
21	9	20,8	Masculino	09/08/2017	NA	Não	Não	Sim	2
22	10	21	Feminino	16/08/2017	Negativo	Sim	Não	Não	1
23	8	20	Masculino	29/08/2017	NA	Sim	Sim	Não	1
24	2	10	Feminino	06/09/2017	Positivo	Não	NA	Sim	4
25	1	36	Masculino	19/09/2017	NA	Sim	Não	Não	1
26	12	5,8	Feminino	02/10/2017	NA	Não	Sim	Não	3
27	9	44,6	Masculino	07/10/2017	Negativo	Não	Não	Não	2
28	11	4,7	Masculino	12/10/2017	NA	Sim	Não	Não	1



**Tabela descritiva de todos os casos clínicos incluídos no estudo (continuação)**

Paciente	Idade (Anos)	Peso (kg)	Sexo	Data de diagnóstico	Exame a fresco da gota de sangue	Assintomático na altura do diagnóstico <sup>1</sup>	Periodicidade no protocolo de tratamento <sup>2</sup>	Morte <sup>3</sup>	Estádio clínico (1 – 4)
29	8	24,4	Masculino	13/10/2017	Negativo	Não	Sim	Sim	3
30	9	10	Feminino	16/10/2017	Negativo	Não	NA	Não	3
31	7	30,2	Masculino	18/10/2017	Negativo	Não	Não	Não	2
32	5	35	Masculino	26/10/2017	Positivo	Sim	Não	Não	1
33	12	24	Masculino	31/10/2017	NA	Sim	Não	Não	1
34	10	25,2	Masculino	07/11/2017	Positivo	Não	Sim	Não	2
35	9	26	Masculino	10/12/2017	Positivo	Não	Sim	Não	2
36	3	7	Feminino	14/12/2017	Positivo	Sim	Não	Não	1
37	3	3,4	Feminino	21/12/2017	NA	Não	Não	Não	1
38	7	27	Feminino	26/12/2017	Negativo	Não	Sim	Sim	3
39	4	10	Feminino	29/12/2017	Negativo	Sim	NA	Não	1
40	12	21	Masculino	29/12/2017	Positivo	Não	Sim	Não	3
41	3	11,85	Masculino	29/12/2017	Positivo	Sim	Sim	Não	1
42	5	29	Feminino	29/12/2017	Positivo	Não	Sim	Não	1
43	8	10	Feminino	25/01/2018	Positivo	Sim	Sim	Não	1
NA: Não Realizado									

<sup>1</sup> Não inclui sinais clínicos ligeiros.

<sup>2</sup> Refere-se ao cumprimento temporal do protocolo terapêutico padrão. Quando o estado clínico do animal não o permitia, a periodicidade do protocolo não era respeitada, adiando-se sobretudo o tratamento aditívica.

<sup>3</sup> Considerando mortes ocorridas durante o período de realização do estudo (entre Agosto 2017 a Janeiro 2018).



## Anexo II

### Radiografias torácicas de alguns dos casos estudados

Figura 1. Macho, 8 anos. Projeção LL e VD. Padrão alveolar visível nos lobos pulmonares caudais, na projeção LL e no lobo caudal direito, na projecção VD. Este animal apresentava tosse ligeira.

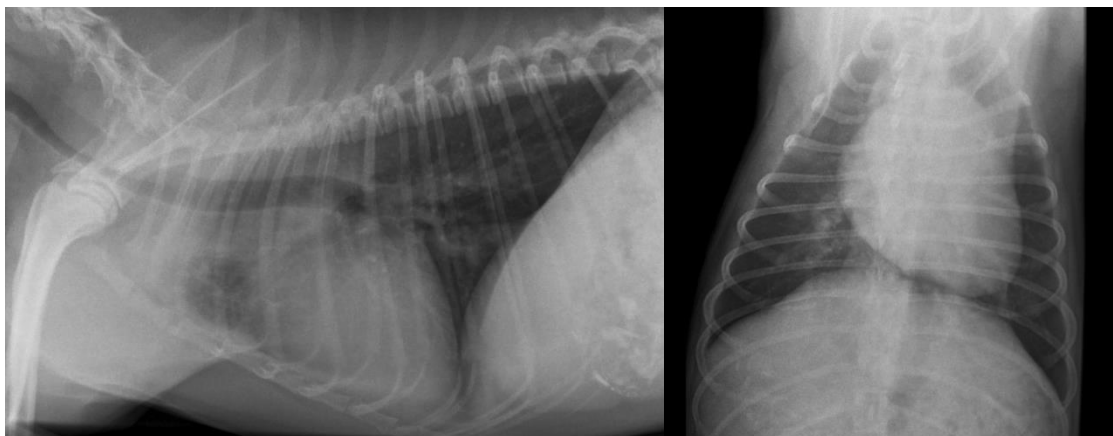


Figura 2. Macho, 10 anos. Projeção LL e VD. Padrão pulmonar misto e silhueta cardíaca com ligeira aparência de “D” invertido. Este animal apresentava um sopro holossistólico de grau II/VI mais audível no hemitórax direito, tosse e um d-dímero de 18,4 mg/L na altura da realização desta radiografia.

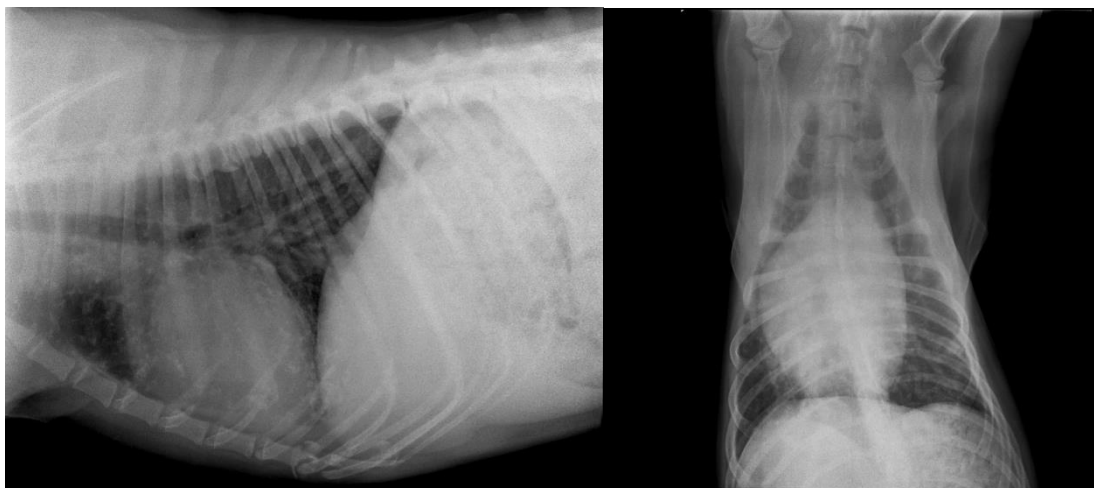


Figura 3. Fêmea, 10 anos. Projeção LL. Padrão pulmonar misto e radiopacidades compatíveis com focos de mineralização brônquica devido à idade avançada ou nódulos parasitários nos lobos pulmonares caudais. Assintomática.



Figura 4. Macho, 10 anos, projeção LL e VD. Cardiomegália generalizada sugerida pelo aspeto globoso do coração. Assintomático.

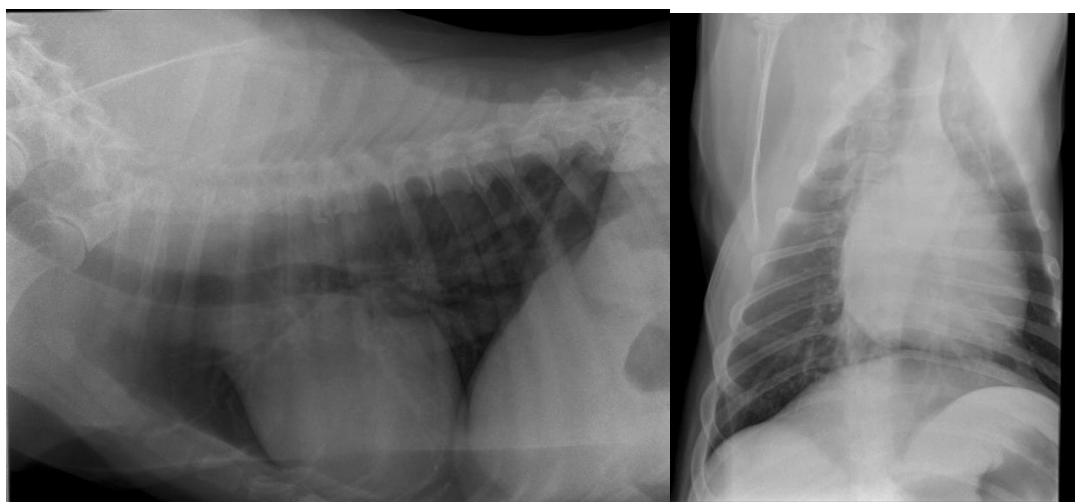


Figura 5. Macho, 9 anos. Projeção LL. Grave dilatação e tortuosidade das artérias pulmonares craniais, artérias lobares e tronco pulmonar. Observa-se ainda o desvio dorsal da traqueia por dilatação do átrio direito. Este animal apresentava um d-dímero de 3,4 mg/L e acabou por falecer 5 meses após o diagnóstico de DCC.

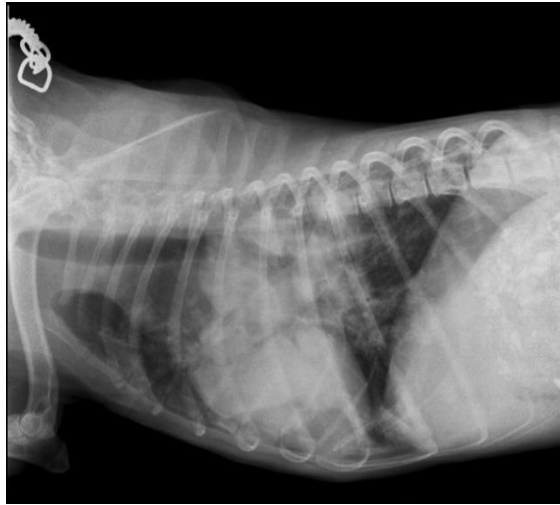


Figura 6. Macho, 12 anos. Projeção LL. Sem alterações dignas de registo. Assintomático.



Figura 7. Macho, 12 anos. Projeção LL e VD. Padrão pulmonar misto e edema peri-hilar. Na projeção VD observa-se um nódulo (seta) no segmento caudal do lobo cranial esquerdo, que poderia ser compatível com um granuloma eosinofílico parasitário. Este animal apresentava tosse moderada e através de ecocardiografia verificou-se que sofria de hipertensão pulmonar.

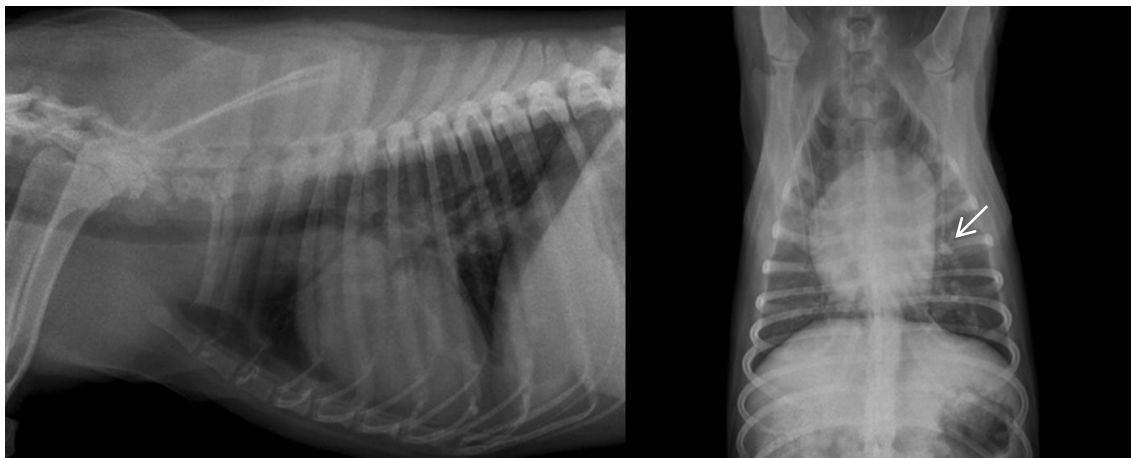


Figura 8. Fêmea, 5 anos. Projeção LL e VD. Silhueta cardíaca com aspeto de “D” invertido na projecção VD. Assintomática.

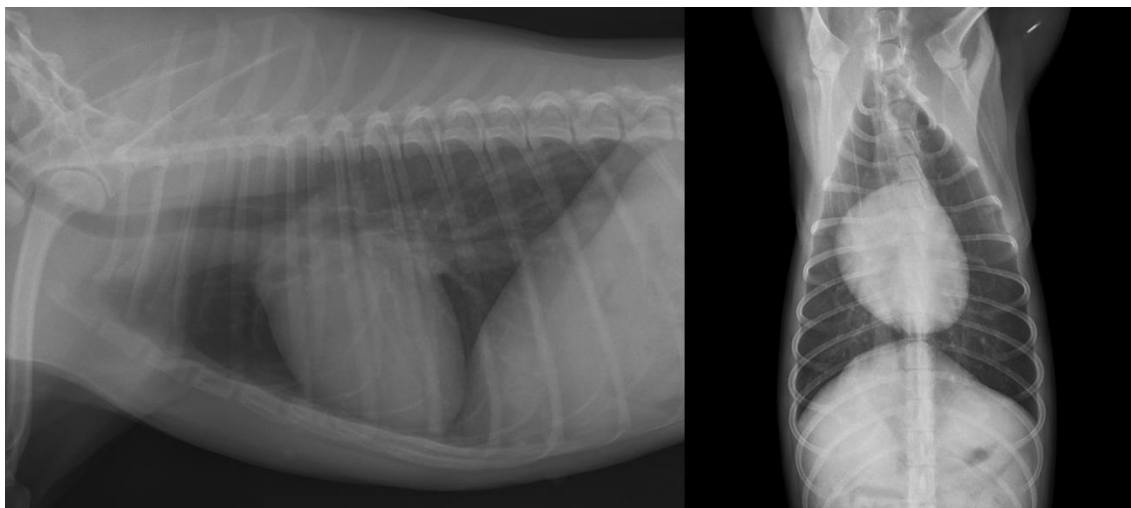


Figura 9. Fêmea, 6 anos. Projeção LL e VD. Dilatação discreta do átrio direito visível na projeção VD. Este animal apresentava um d-dímero de 14,11 mg/L na altura da realização desta radiografia. Assintomática.



Figura 10. Macho, 7 anos. Projeção LL e VD. Dilatação discreta do átrio direito notória na projeção VD. Assintomático.



Figura 11. Fêmea, 12 anos. Projeção LL e VD. Marcação da árvore brônquica notória na projecção LL, ligeiro edema peri-hilar e traqueíte. Cardiomegália visível sobretudo na projecção VD. Este animal apresentava tosse frequente e intolerância ao exercício.

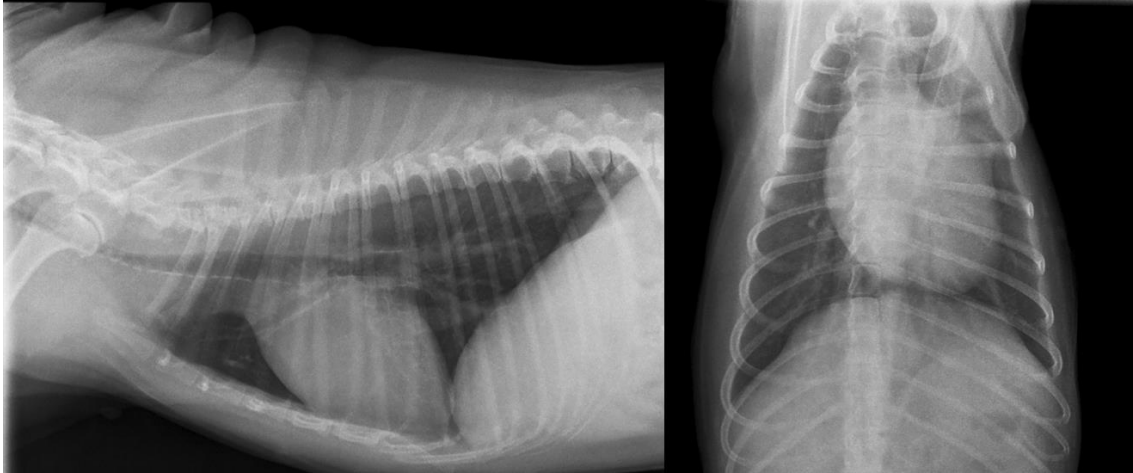


Figura 12. Macho, 8 anos. Projeção LL após internamento por dispneia intensa. Edema difuso com apagamento da silhueta cardíaca.

